

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2-celler | 300663**Generell informasjon****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 er en genomredigert human osteosarkomcellelinje avledet fra U2OS-celler, hvor det endogene RANBP2-lokuset (også kjent som NUP358) er modifisert ved hjelp av CRISPR/Cas9 for å kode for et SNAPf-merke i rammen med det naturlige proteinet. Nup358/RanBP2 er et stort nukleoporin lokalisert til cytoplasmatiske filamenter i kjerneporekomplekset (NPC) og spiller en avgjørende rolle i nukleocytoplasmatiske transport, SUMOylering og mitotiske prosesser. Endogen merking sikrer at SNAPf-Nup358 uttrykkes under fysiologisk promotorkontroll, opprettholder naturlige ekspresjonsnivåer og minimerer artefakter assosiert med overekspressjonssystemer.

SNAPf-taggen er en hurtigmerkingsvariant av SNAP-taggen som kovalent binder benzyguaninkonjugerte substrater, noe som muliggjør selektiv og stabil fluorescerende merking av Nup358 i levende eller fikserte celler. I U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2-celler lokaliseres fusjonsproteinene til kjernemembranen i en punktformet fordeling som er karakteristisk for cytoplasmatiske NPC-filamenter. Denne konfigurasjonen støtter høyoppløselig fluorescensavbildning, superoppløselig mikroskopi, puls-jakt-merking og enkeltmolekylsporing for å studere NPC-arkitektur og -dynamikk. Den flate morfologien og de store kjernene i U2OS-celler letter ytterligere kvantitativ avbildning av kjernemembranstrukturer.

Denne modellen muliggjør undersøkelse av Nup358-spesifikke roller i CRM1/eksportinavhengig nukleær eksport, Ran GTPase-syklusregulering og den romlige organiseringen av cytoplasmatiske transportplattformer. Gitt Nup358s involvering i mitotisk spindelmontering og kinetokorfunksjon, er cellelinjen også egnet for å studere cellecyklusavhengig omfordeling av nukleoporiner og NPC-demontering/montering under mitose. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 gir en fysiologisk relevant plattform for å dissekere strukturelle og funksjonelle aspekter av den cytoplasmatiske siden av kjerneporekomplekset i humane celler.

Organism Menneskelig**Tissue** Bein**Disease** Osteosarkom**Kjennetegn****Age** 15 år**Gender** Kvinne**Ethnicity** Kaukasisk**Morphology** Epitel-lignende**Growth properties** Vedhengende

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2-celler | 300663

Regulatoriske data

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (Cytion katalognummer 300663)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
Depositor	Ellenberg-laboratoriet (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Denne humane osteosarkomcellelinjen (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) inneholder en CRISPR-konstruert SNAPf-Nup358/RanBP2-fusjon som muliggjør presis merking av cytoplasmatiske fibriller i kjerneporen. Modifikasjonen er stabilt integrert. Denne klassifiseringen gjelder bare i Tyskland og kan variere andre steder.

Biomolekylære data

Protein expression	Nup358/RanBP2, SNAPf-tag
---------------------------	--------------------------

Håndtering

Culture Medium	McCoy's 5a, m: 3,0 g/L glukose, m: stabil glutamin, m: 2,0 mM natriumpyruvat, m: 2,2 g/L NaHCO ₃ (Cytion artikkelnummer 820200a)
Supplements	Suppler med 10 % FBS, 3,0 g/L glukose, stabil glutamin, 2,0 mM natriumpyruvat, 2,2 g/L NaHCO ₃ , 1 % NEAA
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Fjern det gamle mediet fra de adherente cellene, og vask dem med PBS uten kalsium og magnesium. Bruk 3-5 ml PBS for T25-kolber og 5-10 ml for T75-kolber. Dekk deretter cellene helt med Accutase, med 1-2 ml for T25-kolber og 2,5 ml for T75-kolber. La cellene inkubere i romtemperatur i 8-10 minutter for å løsne dem. Etter inkubasjon blandes cellene forsiktig med 10 ml medium for å resuspendere dem, og sentrifuger deretter ved 300xg i 3 minutter. Kast supernatanten, resuspendere cellene i nytt medium, og overfør dem til nye kolber som allerede inneholder nytt medium.
Freeze medium	Som kryopreserveringsmedium bruker vi komplett vekstmedium (inkludert FBS) + 10 % DMSO for tilstrekkelig levedyktighet etter opptining, eller CM-1 (Cytion-katalognummer 800100), som inneholder optimaliserte osmobeskyttende midler og metabolske stabilisatorer for å øke utvinningen og redusere kryoinduisert stress.

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2-celler | 300663**Thawing and
Culturing Cells**

1. Kontroller at hetteglasset er dypfrysst ved levering, ettersom cellene sendes på tørris for å opprettholde optimale temperaturer under transport.
2. Ved mottak skal hetteglasset enten oppbevares umiddelbart ved temperaturer under $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ for å sikre at cellenes integritet bevares, eller gå videre til trinn 3 hvis umiddelbar dyrking er nødvendig.
3. Ved umiddelbar dyrking tiner du hetteglasset raskt ved å senke det ned i et $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ varmt vannbad med rent vann og et antimikrobielt middel, og røre forsiktig i 40-60 sekunder til det blir en liten isklump igjen.
4. Utfør alle påfølgende trinn under sterile forhold i en strømningshette, og desinfiser kryoflasken med 70 % etanol før du åpner den.
5. Åpne det desinfiserte hetteglasset forsiktig, og overfør cellesuspensjonen til et 15 ml sentrifugerør som inneholder 8 ml romtemperert dyrkingsmedium, og bland forsiktig.
6. Sentrifuger blandingen ved $300 \times g$ i 3 minutter for å separere cellene, og kast supernatanten som inneholder rester av frysemedium, forsiktig.
7. Resuspender cellepelleten forsiktig i 10 ml nytt dyrkingsmedium. For adherente celler, del suspensjonen mellom to T25-kulturkolber; for suspensjonskulturer, overfør alt mediet til én T25-kolbe for å fremme effektiv celleinteraksjon og vekst.
8. Følg etablerte subkulturprotokoller for fortsatt vekst og vedlikehold av cellelinjen, noe som sikrer pålitelige eksperimentelle resultater.

**Incubation
Atmosphere**

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , befuktet atmosfære.

Flask Coating

Ingen

**Freezing
Procedure**

Kryopreserverte cellelinjer sendes på tørris i validert, isolert emballasje med tilstrekkelig kjølemiddel til å opprettholde en temperatur på ca. $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hele transporten. Ved mottak skal beholderen inspiseres umiddelbart, og hetteglassene skal straks overføres til egnet lagringsplass.

**Shipping
Conditions**

Kryopreserverte cellelinjer sendes på tørris i validert, isolert emballasje med tilstrekkelig kjølemiddel til å opprettholde en temperatur på ca. $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hele transporten. Ved mottak skal beholderen inspiseres umiddelbart, og hetteglassene skal straks overføres til egnet lagringsplass.

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2-celler | 300663

Storage Conditions

For langtidsoppbevaring plasseres hetteglassene i flytende nitrogen i dampfase ved ca. -150 til -196 °C. Lagring ved -80 °C er kun akseptabelt som et kort mellomtrinn før overføring til flytende nitrogen.

Kvalitetskontroll / Genetisk profil / HLA

Sterility

Mykoplasma-kontaminering utelukkes ved hjelp av både PCR-baserte analyser og luminescensbaserte metoder for påvisning av mykoplasma.

For å sikre at det ikke finnes bakterie-, sopp- eller gjærkontaminering, blir cellekulturene inspisert visuelt hver dag.