

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 overekspresjonssystemer.

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**Metastatic site** Primærsvulstens lokalisering (bein)**Applications** Biologi knyttet til cytoplasmatiske filamenter i kjerneporekomplekset; Nup358/RanBP2 i CRM1-mediert eksport fra kjernen; Ran-GTPase-syklusen; SUMO-signalveien; dannelse av mitotisk spindel; sporing av enkeltpartikler; superoppløsningsmikroskopi; SNAP-puls-chase-merking; arkitekturen på den cytoplasmatiske siden av NPC**Kjennetegn****Age** 15 år**Gender** Kvinne**Ethnicity** Kaukasisk

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

Morphology Epitel-lignende

Cell type Epitelceller (osteosarkom)

Growth properties Vedhengende

Regulatoriske data

Citation U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (Cytion katalognummer 300663)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

CellosaurusAccession Ikke tildelt (CRISPR-modifisert U2OS-derivat; foreldrecelle U2OS CVCL_0042)

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 NaHCO₃ (Cytion artikkelnummer 820200a)

Supplements Suppler med 10 % FBS, 3,0 g/L glukose, stabil glutamin, 2,0 mM natriumpyruvat, 2,2 g/L NaHCO₃, 1 % NEAA

Dissociation Reagent Accutase

Doubling time ca. 24 til 36 timer

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

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.

Split ratio 1 til 3

Seeding density 1 til 3×10^4 celler/cm²

Fluid renewal 2 til 3 ganger per uke

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 kryoundusert stress.

Thawing and Culturing Cells

1. Kontroller at hetteglasset er dypfrost 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 °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 °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 x g i 3 minutter for å separere cellene, og kast supernatanten som inneholder rester av frysemedium, forsiktig.
7. Resuspendere cellepelletten forsiktig i 10 ml nytt dyrkningsmedium. 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.

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

Incubation Atmosphere 37 °C, 5 %_{CO2}, 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 °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 °C under hele transporten. Ved mottak skal beholderen inspiseres umiddelbart, og hetteglassene skal straks overføres til egnet lagringsplass.

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.