

Komórki U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663**Informacje ogólne****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 to zmodyfikowana genetycznie linia komórek ludzkiego osteosarcoma pochodząca z komórek U2OS, w której endogenny locus RANBP2 (znany również jako NUP358) został zmodyfikowany za pomocą CRISPR/Cas9 w celu kodowania tagu SNAPf w ramce z natywnym białkiem. Nup358/RanBP2 jest dużym nukleoporinem zlokalizowanym w cytoplazmatycznych włóknach kompleksu porów jądrowych (NPC) i odgrywa kluczową rolę w transporcie jądrowo-cytoplazmatycznym, SUMOylacji i procesach mitotycznych. Endogeniczne znakowanie zapewnia, że SNAPf-Nup358 jest wyrażany pod fizjologiczną kontrolą promotora, utrzymując natywne poziomy ekspresji i minimalizując artefakty związane z systemami nadekspresji.

Tag SNAPf jest szybko znakującym wariantem tagu SNAP, który kowalencyjnie wiąże substraty sprzężone z benzyloguaniną, umożliwiając selektywne i stabilne znakowanie fluorescencyjne Nup358 w żywych lub utrwalonych komórkach. W komórkach U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 białko fuzyjne lokalizuje się w otocze jądra komórkowego w postaci punktowej dystrybucji charakterystycznej dla cytoplazmatycznych włókien NPC. Taka konfiguracja umożliwia obrazowanie fluorescencyjne w wysokiej rozdzielczości, mikroskopie superrozdzielczą, znakowanie metodą pulse-chase oraz śledzenie pojedynczych cząsteczek w celu badania architektury i dynamiki NPC. Płaska morfologia i duże jądra komórek U2OS dodatkowo ułatwiają ilościowe obrazowanie struktur błony jądrowej.

Model ten umożliwia badanie specyficznych ról Nup358 w eksporcie jądrowym zależnym od CRM1/eksportyny, regulacji cyklu Ran GTPazy oraz organizacji przestrzennej cytoplazmatycznych platform transportowych. Biorąc pod uwagę udział Nup358 w tworzeniu wrzeciona mitotycznego i funkcji kinetochoru, linia komórkowa nadaje się również do badania zależnej od cyklu komórkowego redystrybucji nukleoporin oraz rozkładu/ponownego składania NPC podczas mitozy. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 stanowi fizjologicznie istotną platformę do analizy strukturalnych i funkcjonalnych aspektów cytoplazmatycznej powierzchni kompleksu porów jądrowych w komórkach ludzkich.

Organism Człowiek**Tissue** Kość**Disease** Mięsak kościopochodny**Metastatic site** Miejsce występowania guza pierwotnego (kość)**Applications** Biologia włókien cytoplazmatycznych kompleksu porów jądrowych; rola białka Nup358/RanBP2 w eksporcie jądrowym za pośrednictwem CRM1; cykl GTPazy Ran; szlak SUMO; tworzenie wrzeciona mitotycznego; śledzenie pojedynczych cząstek; mikroskopia superrozdzielczą; znakowanie metodą SNAP „pulse-chase”; architektura strony cytoplazmatycznej kompleksu porów jądrowych**Charakterystyka****Age** 15 lat

Komórki U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663**Gender** Kobieta**Ethnicity** Kaukaski**Morphology** Podobny do nabłonka**Cell type** Komórki nabłonkowe (osteosarcoma)**Growth properties** Adherent**Dane regulacyjne****Citation** U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (numer katalogowy Cytion 300663)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** Nieprzypisane (odmiana komórek U2OS zmodyfikowana metodą CRISPR; komórki macierzyste U2OS CVCL_0042)**Depositor** Laboratorium Ellenberg (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Ta ludzka linia komórek kostniakomięsaka (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) zawiera zmodyfikowaną metodą CRISPR fuzję SNAPf-Nup358/RanBP2 umożliwiającą precyzyjne znakowanie cytoplazmatycznych włókienek porów jądrowych. Modyfikacja jest stabilnie zintegrowana. Ta klasyfikacja ma zastosowanie tylko w Niemczech i może się różnić w innych krajach.**Dane biomolekularne****Protein expression** Nup358/RanBP2, tag SNAPf**Obsługa****Culture Medium** McCoys 5a, w: 3,0 g/l glukozy, w: stabilna glutamina, w: 2,0 mM pirogronianu sodu, w: 2,2 g/l NaHCO₃ (numer artykułu Cytion 820200a)**Supplements** Uzupełnić pożywkę o 10% FBS, 3,0 g/l glukozy, stabilną glutaminę, 2,0 mM pirogronianu sodu, 2,2 g/l NaHCO₃, 1% NEAA

Komórki U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** ok. 24–36 godzin**Subculturing** Usuń starą pożywkę z przylegających komórek i przemyj je PBS, który nie zawiera wapnia i magnezu. W przypadku kolb T25 należy użyć 3-5 ml PBS, a w przypadku kolb T75 5-10 ml. Następnie całkowicie pokryj komórki Accutase, używając 1-2 ml dla kolb T25 i 2,5 ml dla kolb T75. Pozwól komórkom inkubować w temperaturze pokojowej przez 8-10 minut, aby je oddzielić. Po inkubacji delikatnie wymieszaj komórki z 10 ml pożywki, aby ponownie je zawiesić, a następnie odwiruj przy 300xg przez 3 minuty. Odrzuć supernatant, ponownie zawiesić komórki w świeżej pożywce i przenieść je do nowych kolb zawierających już świeżą pożywkę.**Split ratio** od 1 do 3**Seeding density** od 1 do 3×10^4 komórek/cm²**Fluid renewal** 2 do 3 razy w tygodniu**Freeze medium** Jako pożywki do kriokonserwacji używamy kompletnej pożywki wzrostowej (w tym FBS) + 10% DMSO w celu zapewnienia odpowiedniej żywotności po rozmrożeniu lub CM-1 (numer katalogowy Cytion 800100), która zawiera zoptymalizowane osmoprotektanty i stabilizatory metaboliczne w celu zwiększenia regeneracji i zmniejszenia stresu wywołanego kriokonserwacją.

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

1. Upewnij się, że fiolka pozostaje głęboko zamrożona w momencie dostawy, ponieważ komórki są wysyłane w suchym lodzie, aby utrzymać optymalną temperaturę podczas transportu.
2. Po otrzymaniu należy natychmiast przechowywać fiolkę w temperaturze poniżej -150°C , aby zapewnić zachowanie integralności komórek, lub przejść do kroku 3, jeśli wymagana jest natychmiastowa hodowla.
3. W przypadku natychmiastowej hodowli należy szybko rozmrozić fiolkę, zanurzając ją w łaźni wodnej o temperaturze 37°C z czystą wodą i środkiem przeciwdrobnoustrojowym, delikatnie mieszając przez 40-60 sekund, aż pozostanie niewielka grudka lodu.
4. Wykonaj wszystkie kolejne kroki w sterylnych warunkach w kapturze przepływowej, dezynfekując fiolkę 70% etanolem przed otwarciem.
5. Ostrożnie otworzyć zdezynfekowaną fiolkę i przenieść zawiesinę komórek do 15 ml probówki wirówkowej zawierającej 8 ml podłoża hodowlanego o temperaturze pokojowej, delikatnie mieszając.
6. Wirować mieszaninę z prędkością $300 \times g$ przez 3 minuty w celu oddzielenia komórek i ostrożnie odrzucić supernatant zawierający pozostałości pożywki do zamrażania.
7. Delikatnie ponownie zawiesić osad komórek w 10 ml świeżego podłoża hodowlanego. W przypadku komórek przylegających, rozdzielić zawiesinę pomiędzy dwie kolby hodowlane T25; w przypadku hodowli zawieszonych, przenieść całą pożywkę do jednej kolby T25 w celu promowania skutecznej interakcji i wzrostu komórek.
8. Przestrzegaj ustalonych protokołów podhodowli w celu ciągłego wzrostu i utrzymania linii komórkowej, zapewniając wiarygodne wyniki eksperymentów.

**Incubation
Atmosphere**

37°C , 5% CO_2 , nawilżona atmosfera.

Flask Coating

Brak

**Freezing
Procedure**

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiolki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

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

Shipping Conditions

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiołki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Storage Conditions

W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiołki w ciekłym azocie w fazie lotnej w temperaturze od -150 do -196°C . Przechowywanie w temperaturze -80°C jest dopuszczalne tylko jako krótki etap przejściowy przed przeniesieniem do ciekłego azotu.

Kontrola jakości / Profil genetyczny / HLA

Sterility

Zanieczyszczenie mykoplazmą jest wykluczane przy użyciu zarówno testów opartych na PCR, jak i metod wykrywania mykoplazmy opartych na luminescencji.

Aby upewnić się, że nie ma zanieczyszczenia bakteriami, grzybami lub drożdżami, hodowle komórkowe są poddawane codziennym kontrolom wizualnym.