

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 endogeny 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**Charakterystyka****Age** 15 lat**Gender** Kobieta**Ethnicity** Kaukaski**Morphology** Podobny do nabłonka

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

Growth properties Adherent

Dane regulacyjne

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

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

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 Uzpełnić pożywkę o 10% FBS, 3,0 g/l glukozy, stabilną glutaminę, 2,0 mM pirogronianu sodu, 2,2 g/l NaHCO₃, 1% NEAA

Dissociation Reagent Accutase

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. Odrzucić supernatant, ponownie zawiesić komórki w świeżej pożywce i przenieść je do nowych kolb zawierających już świeżą pożywkę.

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

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 zawiesinowych, 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

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

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 cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiołki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

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 wykluczone 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.