

Células U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663**Informações gerais****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 é uma linha celular de osteossarcoma humano editada genómicamente, derivada de células U2OS, na qual o locus endógeno RANBP2 (também conhecido como NUP358) foi modificado por CRISPR/Cas9 para codificar uma etiqueta SNAPf em quadro com a proteína nativa. Nup358/RanBP2 é uma grande nucleoporina localizada nos filamentos citoplasmáticos do complexo de poros nucleares (NPC) e desempenha papéis críticos no transporte nucleocitoplasmático, SUMOilação e processos mitóticos. A marcação endógena garante que SNAPf-Nup358 seja expresso sob o controlo fisiológico do promotor, mantendo os níveis de expressão nativos e minimizando artefactos associados a sistemas de superexpressão.

A etiqueta SNAPf é uma variante de marcação rápida da etiqueta SNAP que se liga covalentemente a substratos conjugados com benzilguanina, permitindo a marcação fluorescente seletiva e estável de Nup358 em células vivas ou fixas. Nas células U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2, a proteína de fusão localiza-se no envelope nuclear numa distribuição pontilhada característica dos filamentos NPC citoplasmáticos. Esta configuração suporta imagens de fluorescência de alta resolução, microscopia de super-resolução, marcação pulse-chase e abordagens de rastreamento de moléculas únicas para estudar a arquitetura e a dinâmica do NPC. A morfologia plana e os núcleos grandes das células U2OS facilitam ainda mais a imagem quantitativa das estruturas do envelope nuclear.

Este modelo permite a investigação das funções específicas da Nup358 na exportação nuclear dependente de CRM1/exportina, na regulação do ciclo da Ran GTPase e na organização espacial das plataformas de transporte citoplasmático. Dado o envolvimento da Nup358 na montagem do fuso mitótico e na função do cinetocoro, a linha celular também é adequada para estudar a redistribuição dependente do ciclo celular das nucleoporinas e a desmontagem/remontagem do NPC durante a mitose. O U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 fornece uma plataforma fisiologicamente relevante para dissecar os aspetos estruturais e funcionais da face citoplasmática do complexo de poros nucleares em células humanas.

Organism Humano**Tissue** Osso**Disease** Osteossarcoma**Metastatic site** Localização do tumor primário (osso)**Applications** Biologia dos filamentos citoplasmáticos do complexo de poros nucleares; Nup358/RanBP2 na exportação nuclear mediada por CRM1; ciclo da GTPase Ran; via SUMO; montagem do fuso mitótico; rastreio de partículas individuais; microscopia de super-resolução; marcação SNAP por pulso-perseguição; arquitetura da face citoplasmática do NPC**Caraterísticas****Age** 15 anos**Gender** Feminino

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

Ethnicity	Caucasiano
Morphology	De tipo epitelial
Cell type	Células epiteliais (osteossarcoma)
Growth properties	Aderente

Dados regulamentares

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (número de catálogo Cytion 300663)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Não atribuído (derivado de U2OS modificado por CRISPR; U2OS parental CVCL_0042)
Depositor	O Laboratório Ellenberg (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Esta linha celular de osteossarcoma humano (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) contém uma fusão SNAPf-Nup358/RanBP2 com engenharia CRISPR que permite a marcação exacta das fibrilhas citoplasmáticas do poro nuclear. A modificação está integrada de forma estável. Esta classificação aplica-se apenas na Alemanha e pode diferir noutros países.

Dados biomoleculares

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

Manuseamento

Culture Medium	McCoy's 5a, com: 3,0 g/L de glucose, com: glutamina estável, com: 2,0 mM de piruvato de sódio, com: 2,2 g/L de NaHCO ₃ (número de artigo Cytion 820200a)
Supplements	Suplementar o meio com 10% de FBS, 3,0 g/L de glucose, glutamina estável, 2,0 mM de piruvato de sódio, 2,2 g/L de NaHCO ₃ , 1% de NEAA
Dissociation Reagent	Accutase

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

Doubling time aprox. 24 a 36 horas

Subculturing Retirar o meio antigo das células aderentes e lavá-las com PBS sem cálcio e magnésio. Nos frascos T25, utilizar 3-5 ml de PBS e, nos frascos T75, 5-10 ml. Em seguida, cobrir completamente as células com Accutase, utilizando 1-2 ml para os frascos T25 e 2,5 ml para os frascos T75. Deixar as células incubar à temperatura ambiente durante 8-10 minutos para as destacar. Após a incubação, misturar suavemente as células com 10 ml de meio para as ressuspender e, em seguida, centrifugar a 300xg durante 3 minutos. Deitar fora o sobrenadante, ressuspender as células em meio fresco e transferi-las para novos frascos que já contenham meio fresco.

Split ratio 1 a 3

Seeding density 1 a 3×10^4 células/cm²

Fluid renewal 2 a 3 vezes por semana

Freeze medium Como meio de criopreservação, utilizamos um meio de crescimento completo (incluindo FBS) + 10% DMSO para uma viabilidade pós-descongelamento adequada, ou CM-1 (número de catálogo Cytion 800100), que inclui osmoprotectores otimizados e estabilizadores metabólicos para melhorar a recuperação e reduzir o stress induzido pela crio.

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

Thawing and Culturing Cells

1. Confirme que o frasco permanece profundamente congelado aquando da entrega, uma vez que as células são enviadas em gelo seco para manter as temperaturas ideais durante o transporte.
2. Após a receção, armazenar o frasco criogénico imediatamente a temperaturas inferiores a -150°C para garantir a preservação da integridade celular, ou avançar para o passo 3 se for necessária uma cultura imediata.
3. Para uma cultura imediata, descongelar rapidamente o frasco imergindo-o num banho de água a 37°C com água limpa e um agente antimicrobiano, agitando suavemente durante 40-60 segundos até ficar um pequeno aglomerado de gelo.
4. Efetuar todos os passos subsequentes em condições estéreis numa capela de fluxo, desinfectando o frasco criogénico com etanol a 70% antes de o abrir.
5. Abrir cuidadosamente o frasco desinfectado e transferir a suspensão de células para um tubo de centrifugação de 15 ml contendo 8 ml de meio de cultura à temperatura ambiente, misturando suavemente.
6. Centrifugar a mistura a $300 \times g$ durante 3 minutos para separar as células e eliminar cuidadosamente o sobrenadante que contém o meio de congelação residual.
7. Ressuspender suavemente o pellet de células em 10 ml de meio de cultura fresco. No caso de células aderentes, dividir a suspensão entre dois frascos de cultura T25; no caso de culturas em suspensão, transferir todo o meio para um frasco T25 para promover uma interação e um crescimento eficazes das células.
8. Cumprir os protocolos de subcultura estabelecidos para o crescimento e manutenção contínuos da linha celular, garantindo resultados experimentais fiáveis.

Incubation Atmosphere

37°C , 5% CO_2 , atmosfera humidificada.

Flask Coating

Nenhum

Freezing Procedure

As linhas celulares criopreservadas são expedidas em gelo seco em embalagens validadas e isoladas com refrigerante suficiente para manter aproximadamente -78°C durante o transporte. Aquando da receção, inspecionar imediatamente o recipiente e transferir sem demora os frascos para um local de armazenamento adequado.

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

Shipping Conditions

As linhas celulares criopreservadas são expedidas em gelo seco em embalagens validadas e isoladas com refrigerante suficiente para manter aproximadamente -78 °C durante o transporte. Aquando da receção, inspecionar imediatamente o recipiente e transferir sem demora os frascos para um local de armazenamento adequado.

Storage Conditions

Para conservação a longo prazo, colocar os frascos em azoto líquido em fase de vapor a uma temperatura entre -150 e -196 °C. O armazenamento a -80 °C é aceitável apenas como um curto passo intermédio antes da transferência para azoto líquido.

Controlo de qualidade / Perfil genético / HLA

Sterility

A contaminação por micoplasma é excluída utilizando ensaios baseados em PCR e métodos de deteção de micoplasma baseados em luminescência.

Para garantir que não há contaminação bacteriana, fúngica ou de leveduras, as culturas de células são sujeitas a inspecções visuais diárias.