

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

Informații generale

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 este o linie celulară de osteosarcom uman editată genetic, derivată din celulele U2OS, în care locusul endogen RANBP2 (cunoscut și sub denumirea de NUP358) a fost modificat prin CRISPR/Cas9 pentru a codifica o etichetă SNAPf în cadru cu proteina nativă. Nup358/RanBP2 este o nucleoporină mare localizată în filamentele citoplasmice ale complexului porilor nucleari (NPC) și joacă un rol esențial în transportul nucleocitoplasmatic, SUMOizarea și procesele mitotice. Etichetarea endogenă asigură că SNAPf-Nup358 este exprimat sub controlul promotorului fiziologic, menținând nivelurile native de expresie și minimizând artefactele asociate sistemelor de supraexpresie.

Eticheta SNAPf este o variantă de etichetare rapidă a etichetei SNAP, care se leagă covalent de substraturile conjugate cu benzilguanină, permițând etichetarea fluorescentă selectivă și stabilă a Nup358 în celule vii sau fixate. În celulele U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2, proteina de fuziune se localizează în învelișul nuclear într-o distribuție punctiformă caracteristică filamentelor NPC citoplasmice. Această configurație susține imagistica fluorescentă de înaltă rezoluție, microscopia de super-rezoluție, marcarea pulse-chase și abordările de urmărire a unei singure molecule pentru a studia arhitectura și dinamica NPC. Morfologia plată și nucleele mari ale celulelor U2OS facilitează și mai mult imagistica cantitativă a structurilor membranei nucleare.

Acest model permite investigarea rolurilor specifice Nup358 în exportul nuclear dependent de CRM1/exportină, reglarea ciclului Ran GTPază și organizarea spațială a platformelor de transport citoplasmice. Având în vedere implicarea Nup358 în asamblarea fusului mitotic și funcția cinetocorului, linia celulară este, de asemenea, potrivită pentru studierea redistribuirii nucleoporinelor dependente de ciclul celular și a dezamblării/reasamblării NPC în timpul mitozei. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 oferă o platformă relevantă din punct de vedere fiziologic pentru disecarea aspectelor structurale și funcționale ale feței citoplasmice a complexului porilor nucleari din celulele umane.

Organism Om

Tissue Os

Disease Osteosarcom

Metastatic site Localizarea tumorii primare (os)

Applications Biologia filamentelor citoplasmice ale complexului porilor nucleari; Nup358/RanBP2 în exportul nuclear mediat de CRM1; ciclul GTPazei Ran; calea SUMO; asamblarea fusului mitotic; urmărirea unei singure particule; microscopie de super-rezoluție; marcarea prin metoda „pulse-chase” cu SNAP; arhitectura feței citoplasmice a NPC

Caracteristici

Age 15 ani

Gender Femei

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

Ethnicity	Caucazian
Morphology	De tip epitelial
Cell type	Celule epiteliale (osteosarcom)
Growth properties	Aderent

Date de reglementare

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (număr de catalog Cytion 300663)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Neatribuit (derivat al liniei U2OS modificat prin CRISPR; linia parentală U2OS CVCL_0042)
Depositor	Laboratorul Ellenberg (EMBL)
GMO Status	OMG-S1: Această linie celulară de osteosarcom uman (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) conține o fuziune SNAPf-Nup358/RanBP2 modificată prin CRISPR care permite marcarea precisă a fibrelor citoplasmice ale porului nuclear. Modificarea este integrată stabil. Această clasificare se aplică numai în Germania și poate diferi în alte țări.

Date biomoleculare

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

Manipulare

Culture Medium	McCoy's 5a, cu: 3,0 g/L glucoză, cu: glutamină stabilă, cu: 2,0 mM piruvat de sodiu, cu: 2,2 g/L NaHCO ₃ (numărul articolului Cytion 820200a)
Supplements	Suplimentați mediul cu 10% FBS, 3,0 g/L glucoză, glutamină stabilă, 2,0 mM piruvat de sodiu, 2,2 g/L NaHCO ₃ , 1% NEAA
Dissociation Reagent	Accutase

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

Doubling time aproximativ 24–36 de ore

Subculturing Îndepărtați mediul vechi de pe celulele aderente și spălați-le cu PBS care nu conține calciu și magneziu. Pentru flacoanele T25, se utilizează 3-5 ml de PBS, iar pentru flacoanele T75, 5-10 ml. Apoi, se acoperă celulele complet cu Accutase, folosind 1-2 ml pentru flacoanele T25 și 2,5 ml pentru flacoanele T75. Lăsați celulele la incubare la temperatura camerei timp de 8-10 minute pentru a le detașa. După incubare, amestecați ușor celulele cu 10 ml de mediu pentru a le resuspenda, apoi centrifugați la 300xg timp de 3 minute. Aruncați supernatantul, resuspendați celulele în mediu proaspăt și transferați-le în flacoane noi care conțin deja mediu proaspăt.

Split ratio 1–3

Seeding density 1 până la 3×10^4 celule/cm²

Fluid renewal de 2 până la 3 ori pe săptămână

Freeze medium Ca mediu de crioconservare, folosim mediu de creștere complet (inclusiv FBS) + 10% DMSO pentru o viabilitate adecvată după dezghețare sau CM-1 (număr de catalog Cytion 800100), care include osmoprotectanți optimizați și stabilizatori metabolici pentru a spori recuperarea și a reduce stresul indus de criogenie.

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

1. Confirmați că flaconul rămâne profund înghețat la livrare, deoarece celulele sunt expediate pe gheață carbonică pentru a menține temperaturi optime în timpul transportului.
2. La primire, fie depozitați crioviola imediat la temperaturi sub -150 °C pentru a asigura păstrarea integrității celulare, fie treceți la etapa 3 dacă este necesară cultivarea imediată.
3. Pentru cultivarea imediată, dezghețați rapid flaconul prin scufundarea acestuia într-o baie de apă la 37 °C cu apă curată și un agent antimicrobian, agitându-l ușor timp de 40-60 de secunde până când rămâne o mică aglomerare de gheață.
4. Se efectuează toate etapele ulterioare în condiții sterile, într-o hotă cu flux, dezinfectând crioviola cu etanol 70% înainte de deschidere.
5. Se deschide cu grijă flaconul dezinfectat și se transferă suspensia celulară într-un tub de centrifugare de 15 ml care conține 8 ml de mediu de cultură la temperatura camerei, amestecând ușor.
6. Se centrifughează amestecul la 300 x g timp de 3 minute pentru a separa celulele și se aruncă cu grijă supernatantul care conține mediul de congelare rezidual.
7. Se resuspendă ușor peletul celular în 10 ml de mediu de cultură proaspăt. Pentru celulele aderente, împărțiți suspensia între două flacoane de cultură T25; pentru culturile în suspensie, transferați tot mediul într-un flacon T25 pentru a promova interacțiunea și creșterea celulară eficientă.
8. Respectați protocoalele de subcultură stabilite pentru creșterea și menținerea continuă a liniei celulare, asigurând rezultate experimentale fiabile.

**Incubation
Atmosphere**

37°C, 5% CO_2 , atmosferă umidificată.

Flask Coating

Niciuna

**Freezing
Procedure**

Liniile celulare crioconservate sunt expediate pe gheață carbonică în ambalaje izolate, validate, cu suficient agent frigorific pentru a menține aproximativ -78 °C pe toată durata transportului. La primire, se inspectează imediat recipientul și se transferă fără întârziere fiolele în depozitul corespunzător.

**Shipping
Conditions**

Liniile celulare crioconservate sunt expediate pe gheață carbonică în ambalaje izolate, validate, cu suficient agent frigorific pentru a menține aproximativ -78 °C pe toată durata transportului. La primire, se inspectează imediat recipientul și se transferă fără întârziere fiolele în depozitul corespunzător.

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

Storage Conditions

Pentru conservarea pe termen lung, flacoanele se plasează în azot lichid în fază de vapori la o temperatură cuprinsă între -150 și -196 °C. Păstrarea la -80 °C este acceptabilă doar ca o scurtă etapă intermediară înainte de transferul în azot lichid.

Controlul calității / Profil genetic / HLA

Sterility

Contaminarea cu micoplasmă este exclusă utilizând atât teste bazate pe PCR, cât și metode de detectare a micoplasmei bazate pe luminescență.

Pentru a se asigura că nu există contaminare bacteriană, fungică sau de drojdie, culturile celulare sunt supuse unor inspecții vizuale zilnice.