

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2-celler | 300663**Allmän information****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 är en genredigerad human osteosarkomcellinje som härrör från U2OS-celler, där den endogena RANBP2-lokusen (även känd som NUP358) har modifierats med CRISPR/Cas9 för att koda en SNAPf-tagga i ram med det naturliga proteinet. Nup358/RanBP2 är ett stort nukleoporin som lokaliserar till cytoplasmiska filament i kärnporekomplexet (NPC) och spelar en avgörande roll i nukleocytoplasmisk transport, SUMOylering och mitotiska processer. Endogen märkning säkerställer att SNAPf-Nup358 uttrycks under fysiologisk promotorkontroll, vilket bibehåller naturliga expressionsnivåer och minimerar artefakter associerade med överuttryckssystem.

SNAPf-taggen är en snabbmärkningsvariant av SNAP-taggen som kovalent binder bensylguaninkonjugerade substrat, vilket möjliggör selektiv och stabil fluorescerande märkning av Nup358 i levande eller fixerade celler. I U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2-celler lokaliserar fusionsproteinet till kärnmembranet i en punktformig distribution som är karakteristisk för cytoplasmiska NPC-filament. Denna konfiguration stödjer högupplöst fluorescensavbildning, superupplöst mikroskopi, puls-chase-märkning och spårning av enskilda molekyler för att studera NPC-arkitektur och -dynamik. Den plana morfologin och de stora kärnorna i U2OS-celler underlättar ytterligare kvantitativ avbildning av kärnmembranstrukturer.

Denna modell möjliggör undersökning av Nup358-specifika roller i CRM1/exportinberoende kärnexport, Ran GTPas-cykelreglering och den rumsliga organisationen av cytoplasmiska transportplattformar. Med tanke på Nup358:s inblandning i mitotisk spindelmontering och kinetokorfunktion är cellinjen också lämplig för att studera cellcykelberoende omfördelning av nukleoporiner och NPC-demontering/återmontering under mitos. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 utgör en fysiologiskt relevant plattform för att analysera strukturella och funktionella aspekter av den cytoplasmiska ytan av kärnporekomplexet i humana celler.

Organism Människan**Tissue** Ben**Disease** Osteosarkom**Metastatic site** Primärtumörens lokalisering (ben)**Applications** Biologi hos cytoplasmiska filament i kärnporekomplexet; Nup358/RanBP2 vid CRM1-medierad kärnexport; Ran-GTPas-cykeln; SUMO-vägen; bildandet av mitotisk spindel; spårning av enskilda partiklar; superupplösningsmikroskopi; SNAP-puls-chase-märkning; arkitekturen hos kärnporekomplexets cytoplasmiska yta**Egenskaper****Age** 15 år**Gender** Kvinna

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

Ethnicity	Kaukasisk
Morphology	Epitelliknande
Cell type	Epithelceller (osteosarkom)
Growth properties	Följsam

Lagstadgade uppgifter

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (Cytion katalognummer 300663)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Ej tilldelad (CRISPR-modifierad U2OS-derivat; ursprunglig U2OS CVCL_0042)
Depositor	Ellenberg-laboratoriet (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Denna mänskliga osteosarkomcellinje (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) innehåller en CRISPR-konstruerad SNAPf-Nup358/RanBP2-fusion som möjliggör exakt märkning av cytoplasmiska fibriller i kärnporen. Modifieringen är stabilt integrerad. Denna klassificering gäller endast inom Tyskland och kan skilja sig åt på andra håll.

Biomolekylära data

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

Hantering

Culture Medium	McCoy's 5a, w: 3,0 g/L Glukos, w: stabil Glutamin, w: 2,0 mM Natriumpyruvat, w: 2,2 g/L NaHCO ₃ (Cytion artikelnummer 820200a)
Supplements	Komplettera med 10% FBS, 3,0 g/L glukos, stabil glutamin, 2,0 mM natriumpyruvat, 2,2 g/L NaHCO ₃ , 1% NEAA
Dissociation Reagent	Accutase

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

Doubling time ca 24 till 36 timmar

Subculturing Ta bort det gamla mediet från de adherenta cellerna och tvätta dem med PBS som saknar kalcium och magnesium. Använd 3-5 ml PBS för T25-kolvar och 5-10 ml för T75-kolvar. Täck sedan cellerna helt med Accutase, använd 1-2 ml för T25-kolvar och 2,5 ml för T75-kolvar. Låt cellerna inkubera i rumstemperatur i 8-10 minuter så att de lossnar. Efter inkubationen, blanda cellerna försiktigt med 10 ml medium för att resuspendera dem och centrifugera sedan vid 300xg i 3 minuter. Kassera supernatanten, resuspendera cellerna i färskt medium och överför dem till nya kolvar som redan innehåller färskt medium.

Split ratio 1 till 3

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

Fluid renewal 2 till 3 gånger per vecka

Freeze medium Som kryokonserveringsmedium använder vi komplett tillväxtmedium (inklusive FBS) + 10% DMSO för adekvat viabilitet efter upptining, eller CM-1 (Cytion katalognummer 800100), som innehåller optimerade osmoprotektanter och metaboliska stabilisatorer för att förbättra återhämtningen och minska kryoinducerad stress.

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

Thawing and Culturing Cells

1. Bekräfta att flaskan är djupfryst vid leverans, eftersom cellerna skickas på torris för att bibehålla optimala temperaturer under transporten.
2. Vid mottagandet ska du antingen förvara kryovialen omedelbart vid temperaturer under $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ för att säkerställa att cellernas integritet bevaras, eller gå vidare till steg 3 om omedelbar odling krävs.
3. Vid omedelbar odling ska injektionsflaskan snabbt tinas genom att den sänks ned i ett $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vattenbad med rent vatten och ett antimikrobiellt medel och omrörs försiktigt i 40-60 sekunder tills en liten isklump återstår.
4. Utför alla efterföljande steg under sterila förhållanden i en flödeshuv och desinficera kryovialerna med 70 % etanol innan de öppnas.
5. Öppna försiktigt den desinficerade flaskan och överför cellsuspensionen till ett 15 ml centrifugrör som innehåller 8 ml rumstempererat odlingsmedium och blanda försiktigt.
6. Centrifugera blandningen vid $300 \times g$ i 3 minuter för att separera cellerna och kassera försiktigt supernatanten som innehåller resterande frysmedium.
7. Resuspendera försiktigt cellpelleten i 10 ml färskt odlingsmedium. För adherenta celler, fördela suspensionen mellan två T25-kulturkolv; för suspensionskulturer, överför allt medium till en T25-kolv för att främja effektiv cellinteraktion och tillväxt.
8. Följ fastställda subkulturprotokoll för fortsatt tillväxt och underhåll av cellinjen, vilket säkerställer tillförlitliga experimentella resultat.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , befuktad atmosfär.

Flask Coating

Ingen

Freezing Procedure

Kryopreserverade cellinjer skickas på torris i validerade, isolerade förpackningar med tillräckligt med kylmedel för att hålla cirka $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hela transporten. Vid mottagandet ska behållaren omedelbart inspekteras och flaskorna utan dröjsmål överföras till lämplig förvaring.

Shipping Conditions

Kryopreserverade cellinjer skickas på torris i validerade, isolerade förpackningar med tillräckligt med kylmedel för att hålla cirka $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hela transporten. Vid mottagandet ska behållaren omedelbart inspekteras och flaskorna utan dröjsmål överföras till lämplig förvaring.

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

Storage Conditions

För långtidsförvaring, placera flaskorna i flytande kväve i ångfas vid ca -150 till -196 °C. Förvaring vid -80 °C är acceptabelt endast som ett kort mellanliggande steg innan överföring till flytande kväve.

Kvalitetskontroll / Genetisk profil / HLA

Sterility

Mykoplasmakontaminering utesluts med hjälp av både PCR-baserade analyser och luminiscensbaserade metoder för mykoplasmadiagnostik.

För att säkerställa att det inte finns någon kontaminering av bakterier, svamp eller jäst utsätts cellkulturerna för dagliga visuella inspektioner.