

Bunky U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663**Všeobecné informácie****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 je génovo upravená ľudská osteosarkómová bunka odvodená z buniek U2OS, v ktorej bol endogénny lokus RANBP2 (tiež známy ako NUP358) modifikovaný pomocou CRISPR/Cas9 tak, aby kódoval SNAPf tag v rámci natívneho proteínu. Nup358/RanBP2 je veľký nukleoporín lokalizovaný v cytoplazmatických filamentoch komplexu jadrových pórov (NPC) a hrá kľúčovú úlohu v nukleocytoplazmatickom transporte, SUMOylácii a mitotických procesoch. Endogénne značkovanie zabezpečuje, že SNAPf-Nup358 je exprimovaný pod fyziologickou kontrolou promotora, čím sa zachovávajú natívne hladiny expzie a minimalizujú sa artefakty spojené so systémami nadmernej expzie.

Značka SNAPf je variantom značky SNAP s rýchlym značením, ktorý kovalentne viaže substráty konjugované s benzyguanínom, čo umožňuje selektívne a stabilné fluorescenčné značenie Nup358 v živých alebo fixovaných bunkách. V bunkách U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 sa fúzny proteín lokalizuje do jadrovej membrány v bodkovitej distribúcii charakteristickej pre cytoplazmatické NPC filamenty. Táto konfigurácia podporuje vysokorozlišiteľné fluorescenčné zobrazovanie, superrozlišiteľnú mikroskopiú, pulzno-chase značenie a sledovanie jednotlivých molekúl na štúdium architektúry a dynamiky NPC. Plochá morfológia a veľké jadrá buniek U2OS ďalej uľahčujú kvantitatívne zobrazovanie štruktúr jadrovej membrány.

Tento model umožňuje skúmanie špecifických úloh Nup358 v CRM1/exportín-dependentnom jadrovom exporte, regulácii cyklu Ran GTPázy a priestorovej organizácii cytoplazmatických transportných platforiem. Vzhľadom na účasť Nup358 v mitotickom zoskupovaní vretien a funkcii kinetochóru je táto bunková línia vhodná aj na štúdium redistribúcie nukleoporínov závislej od bunkového cyklu a rozkladu/opätovného zoskupovania NPC počas mitózy. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 poskytuje fyziologicky relevantnú platformu na rozbor štruktúrnych a funkčných aspektov cytoplazmatickej strany komplexu jadrových pórov v ľudských bunkách.

Organism Ľudské**Tissue** Kosti**Disease** Osteosarkóm**Metastatic site** Miesto primárneho nádoru (kosť)**Applications** Biológia cytoplazmatických vlákien komplexu jadrových pórov; Nup358/RanBP2 pri jadrovom exporte sprostredkovanom CRM1; cyklus GTPázy Ran; SUMO dráha; zostavovanie mitotického vretien; sledovanie jednotlivých častíc; mikroskopia so superrozlišením; značenie metódou SNAP pulse-chase; architektúra cytoplazmatickej strany komplexu jadrových pórov**Charakteristika****Age** 15 rokov**Gender** Ženy

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

Ethnicity	Kaukazský
Morphology	Epitelu podobné
Cell type	Epitelové bunky (osteosarkóm)
Growth properties	Adherent

Regulačné údaje

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (katalógové číslo Cytion 300663)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Nepriradené (derivát U2OS modifikovaný pomocou CRISPR; rodičovská bunka U2OS CVCL_0042)
Depositor	Ellenbergova laboratória (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Táto ľudská bunková línia osteosarkómu (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) obsahuje fúziu SNAPf-Nup358/RanBP2 vytvorenú pomocou CRISPR, ktorá umožňuje presné značenie cytoplazmatických vlákien jadrového póru. Modifikácia je stabilne integrovaná. Táto klasifikácia platí len v Nemecku a môže sa líšiť v iných krajinách.

Biomolekulárne údaje

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

Spracovanie

Culture Medium	McCoys 5a, w: 3,0 g/l glukóza, w: stabilný glutamín, w: 2,0 mM pyruvát sodný, w: 2,2 g/l NaHCO ₃ (číslo článku Cytion 820200a)
Supplements	Doplňte médium o 10 % FBS, 3,0 g/l glukózy, stabilný glutamín, 2,0 mM pyruvát sodný, 2,2 g/l NaHCO ₃ , 1 % NEAA
Dissociation Reagent	Accutase

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

Doubling time približne 24 až 36 hodín

Subculturing Odstráňte staré médium z adherovaných buniek a premyte ich PBS, ktorý neobsahuje vápnik a horčík. Pre banky T25 použite 3 - 5 ml PBS a pre banky T75 použite 5 - 10 ml. Potom bunky úplne pokryte Accutase, pričom použite 1 - 2 ml pre banky T25 a 2,5 ml pre banky T75. Nechajte bunky inkubovať pri izbovej teplote 8-10 minút, aby sa oddelili. Po inkubácii jemne premiešajte bunky s 10 ml média, aby boli znovu suspendované, a potom ich 3 minúty odstredíte pri 300xg. Supernatant zlikvidujte, bunky znovu rozmiešajte v čerstvom médiu a preneste ich do nových fliaš, ktoré už obsahujú čerstvé médium.

Split ratio 1 až 3

Seeding density 1 až 3×10^4 buniek/cm²

Fluid renewal 2 až 3-krát týždenne

Freeze medium Ako kryokonzervačné médium používame kompletne rastové médium (vrátane FBS) + 10 % DMSO na zabezpečenie primeranej životaschopnosti po rozmrazení alebo CM-1 (katalógové číslo 800100 spoločnosti Cytion), ktoré obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory na zlepšenie regenerácie a zníženie stresu spôsobeného kryom.

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

1. Overte si, že injekčná liekovka zostane pri doručení hlboko zmrazená, pretože bunky sa prepravujú na suchom ľade, aby sa počas prepravy udržala optimálna teplota.
2. Po prijatí buď okamžite uskladnite kryovialku pri teplote nižšej ako $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, aby ste zabezpečili zachovanie bunkovej integrity, alebo prejdite na krok 3, ak je potrebná okamžitá kultivácia.
3. V prípade okamžitej kultivácie injekčnú liekovku rýchlo rozmrazte ponorením do vodného kúpeľa s teplotou $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ s čistou vodou a antimikrobiálnym prostriedkom, pričom ju jemne miešajte 40 - 60 sekúnd, kým nezostane malý ľadový chumáč.
4. Všetky ďalšie kroky vykonajte v sterilných podmienkach v prietokovom digestore a pred otvorením kryovialku dezinfikujte 70 % etanolom.
5. Opatrne otvorte dezinfikovanú fľaštičku a preneste bunkovú suspenziu do 15 ml centrifugačnej skúmavky obsahujúcej 8 ml kultivačného média s izbovou teplotou a jemne premiešajte.
6. Zmes odstreďujte pri $300 \times g$ počas 3 minút, aby sa bunky oddelili, a opatrne zlikvidujte supernatant obsahujúci zvyšky zmrazovacieho média.
7. Pelet buniek jemne resuspendujte v 10 ml čerstvého kultivačného média. V prípade adherentných buniek rozdeľte suspenziu medzi dve kultivačné banky T25; v prípade suspenzných kultúr preneste všetko médium do jednej banky T25, aby ste podporili účinnú interakciu a rast buniek.
8. Dodržiavajte zavedené subkultivačné protokoly na nepretržitý rast a udržiavanie bunkovej línie, čím sa zabezpečia spoľahlivé výsledky experimentov.

**Incubation
Atmosphere**

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , zvlhčená atmosféra.

Flask Coating

Žiadne

**Freezing
Procedure**

Kryokonzervované bunkové línie sa prepravujú na suchom ľade v overených, izolovaných obaloch s dostatočným množstvom chladiva na udržanie teploty približne $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ počas celej prepravy. Po prijatí ihneď skontrolujte obal a bezodkladne premiestnite injekčné liekovky do vhodného skladu.

**Shipping
Conditions**

Kryokonzervované bunkové línie sa prepravujú na suchom ľade v overených, izolovaných obaloch s dostatočným množstvom chladiva na udržanie teploty približne $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ počas celej prepravy. Po prijatí ihneď skontrolujte obal a bezodkladne premiestnite injekčné liekovky do vhodného skladu.

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

Storage Conditions

Na dlhodobé uchovávanie umiestnite injekčné liekovky do kvapalnej fázy dusíka v pare pri teplote približne -150 až -196 °C. Skladovanie pri teplote -80 °C je prijateľné len ako krátky prechodný krok pred presunom do tekutého dusíka.

Kontrola kvality / Genetický profil / HLA

Sterility

Kontaminácia mykoplazmami sa vylučuje pomocou testov založených na PCR a metód detekcie mykoplazmiem založených na luminiscencii.

Aby sa zabezpečilo, že nedošlo ku kontaminácii baktériami, hubami alebo kvasinkami, bunkové kultúry sa denne vizuálne kontrolujú.