

Bunky U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666**Všeobecné informácie****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 je geneticky modifikovaná ľudská osteosarkómová bunková línia odvodená z rodičovského pozadia U2OS, v ktorej bol endogénny lokus NUP133 modifikovaný pomocou editovania genómu sprostredkovaného CRISPR/Cas9 tak, aby kódoval C-terminálnu značku SNAPf. NUP133 je základnou zložkou komplexu Y (komplex NUP107-160), štruktúrneho subkomplexu nevyhnutného pre zostavenie a udržanie komplexu jadrových pórov (NPC). Zavedením kódujúcej sekvencie SNAPf do endogénneho lokusu sa fúzny proteín exprimuje pod pôvodnou regulačnou kontrolou, čím sa zachovávajú fyziologické hladiny expzie a subcelulárna lokalizácia.

Značka SNAPf je rýchlo značkovateľná varianta značky SNAP, umelo vytvorenej O6-alkylguanín-DNA alkyltransferázy, ktorá kovalentne reaguje s benzylguanínom konjugovanými substrátmi. To umožňuje vysoko špecifické a univerzálne fluorescenčné značkovanie Nup133 v živých alebo fixovaných bunkách pomocou bunkovo priepustných alebo nepriepustných SNAP substrátov. V bunkách U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 sa fúzny proteín lokalizuje do jadrovej membrány v bodkovitom vzore charakteristickom pre jadrové pórové komplexy. Keďže značkovanie prebieha na endogénnom mieste, stechiometria a architektúra NPC sú minimálne narušené, čo robí tento model vhodným pre kvantitatívnu mikroskopiu s vysokým rozlíšením, sledovanie jednotlivých molekúl a kinetické analýzy zostavovania a obratu NPC.

Táto bunková línia poskytuje robustnú platformu na štúdium jadrového transportu, dynamiky nukleocytoplazmatického transportu, biogenézy NPC počas interfázy a postmitotickej jadrovej reorganizácie a štruktúrnej organizácie Y-komplexu v rámci pórovitej kostry. Pozadie U2OS ponúka plochú morfológiu a veľké jadrá, čo uľahčuje zobrazovanie s vysokým rozlíšením. Bunky U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 sú obzvlášť vhodné pre experimenty s pulzno-chase značením, korelačnú svetelnú a elektrónovú mikroskopiu a multicolorové zobrazovacie prístupy v kombinácii s ďalšími endogénne značenými nukleoporínmi alebo transportnými faktormi.

Organism Ľudské**Tissue** Kosti**Disease** Osteosarkóm**Metastatic site** Miesto primárneho nádoru (kosť)**Applications** Biológia komplexu jadrových pórov (NPC); architektúra komplexu Nup133/Y; biogenéza NPC; nukleocytoplazmatický transport; mikroskopia s vysokým rozlíšením (STORM/PALM/STED); sledovanie jednotlivých častíc; pulzno-chase SNAP značenie; korelačná svetelná a elektrónová mikroskopia; kvantitatívna stechiometria NPC**Charakteristika****Age** 15 rokov**Gender** Ženy

Bunky U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

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

Regulačné údaje

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (katalógové číslo Cytion 300666)
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 línia ľudských osteosarkómových buniek (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133) obsahuje fúziu SNAPf-Nup133 zavedenú pomocou CRISPR, ktorá umožňuje fluorescenčné značenie nukleoporínu Nup133. Vložka je stabilne prítomná. Táto klasifikácia platí len v Nemecku a môže sa líšiť v iných krajinách.

Biomolekulárne údaje

Protein expression	Nup133, SNAPf-tag
---------------------------	-------------------

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-Nup133 | 300666

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-Nup133 | 300666**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 °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 °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 x 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 °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 °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 °C počas celej prepravy. Po prijatí ihneď skontrolujte obal a bezodkladne premiestnite injekčné liekovky do vhodného skladu.

Bunky U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

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.