

Celice U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663**Splošne informacije****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 je genomsko spremenjena človeška osteosarkomna celična linija, pridobljena iz celic U2OS, v kateri je bil endogeni lokus RANBP2 (znan tudi kot NUP358) spremenjen s CRISPR/Cas9, da kodira oznako SNAPf v okviru naravnega proteina. Nup358/RanBP2 je velik nukleoporin, lokaliziran v citoplazemskih filamentih jedrskega por kompleksa (NPC), ki igra ključno vlogo v nukleocitoplazemskem transportu, SUMOylaciji in mitotičnih procesih. Endogeno označevanje zagotavlja, da se SNAPf-Nup358 izraža pod fiziološkim nadzorom promotorja, ohranja naravne ravni izražanja in zmanjšuje artefakte, povezane s sistemi prekomernega izražanja.

Oznaka SNAPf je hitro označevalna različica oznake SNAP, ki se kovalentno veže na benzilguanin-konjugirane substrate, kar omogoča selektivno in stabilno fluorescenčno označevanje Nup358 v živih ali fiksiranih celicah. V celicah U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 se fuzijski protein lokalizira v jedrni ovojnici v pikastem porazdelitvi, značilni za citoplazemske NPC filamente. Ta konfiguracija podpira visokoločljivo fluorescenčno slikanje, mikroskopijo z visoko ločljivostjo, označevanje s pulzno-zasledovanjem in sledenje posameznih molekul za preučevanje arhitekture in dinamike NPC. Ploščata morfologija in velika jedra celic U2OS dodatno olajšujejo kvantitativno slikanje struktur jedrske ovojnice.

Ta model omogoča preučevanje vlog Nup358 v CRM1/eksportin-odvisnem jedrskem izvozu, regulaciji cikla Ran GTPaze in prostorski organizaciji citoplazemskih transportnih platform. Glede na vpletenost Nup358 v sestavo mitotičnega vretena in delovanje kinetokora je celična linija primerna tudi za preučevanje celičnega cikla odvisne redistribucije nukleoporinov in razstavljanja/ponovnega sestavljanja NPC med mitozo. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 zagotavlja fiziološko relevantno platformo za razčlenitev strukturnih in funkcionalnih vidikov citoplazemske strani jedrskega por kompleksa v človeških celicah.

Organism Človek**Tissue** Kost**Disease** Osteosarkom**Metastatic site** Mesto primarnega tumorja (kost)**Applications** Biologija citoplazemskih filamentov kompleksa jedrskih por; Nup358/RanBP2 pri izvozu iz jedra, ki ga posreduje CRM1; cikel GTPaze Ran; pot SUMO; sestavljanje mitotičnega vretena; sledenje posameznih delcev; mikroskopija s superresolucijo; označevanje s tehniko SNAP pulse-chase; arhitektura citoplazemske strani kompleksa jedrskih por**Značilnosti****Age** 15 let**Gender** Ženske

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

Ethnicity	Kavkaški
Morphology	Epitelijam podobni
Cell type	Epitelijske celice (osteosarkom)
Growth properties	Pripadajoče

Regulativni podatki

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (katalogska številka Cytion 300663)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Ni dodeljeno (derivat celic U2OS, spremenjen s tehnologijo CRISPR; izvorne celice U2OS CVCL_0042)
Depositor	Laboratorij Ellenberg (EMBL)
GMO Status	GSO-S1: Ta celična linija človeškega osteosarkoma (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) vsebuje z inženiringom CRISPR izdelano sintezo SNAPf-Nup358/RanBP2, ki omogoča natančno označevanje citoplazemskih fibril jedrnih por. Modifikacija je stabilno integrirana. Ta razvrstitev velja samo v Nemčiji in se lahko drugje razlikuje.

Biomolekularni podatki

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

Ravnanje s spletno stranjo

Culture Medium	McCoy's 5a, w: 3,0 g/L glukoze, w: stabilen glutamin, w: 2,0 mM natrijevega piruvata, w: 2,2 g/L NaHCO ₃ (številka izdelka Cytion 820200a)
Supplements	Gojišče dopolnite z 10 % FBS, 3,0 g/L glukoze, stabilnim glutaminom, 2,0 mM natrijevega piruvata, 2,2 g/L NaHCO ₃ , 1 % NEAA
Dissociation Reagent	Accutase

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

Doubling time približno 24 do 36 ur

Subculturing Odstranite staro gojišče z adherentnih celic in jih sperite s PBS, ki ne vsebuje kalcija in magnezija. Za bučke T25 uporabite 3-5 ml PBS, za bučke T75 pa 5-10 ml. Nato celice popolnoma prekrijte z Accutase, pri čemer uporabite 1-2 ml za bučke T25 in 2,5 ml za bučke T75. Celice pustite inkubirati pri sobni temperaturi 8-10 minut, da se ločijo. Po inkubaciji celice nežno premešajte z 10 ml gojišča, da se ponovno suspendirajo, nato jih 3 minute centrifugirajte pri 300xg. Zavržite supernatant, ponovno suspendirajte celice v svežem gojišču in jih prenesite v nove bučke, ki že vsebujejo sveže gojišče.

Split ratio 1 do 3

Seeding density 1 do 3×10^4 celic/cm²

Fluid renewal 2 do 3-krat na teden

Freeze medium Kot gojišče za kriokonzervacijo uporabljamo popolno rastno gojišče (vključno s FBS) + 10 % DMSO za ustrezno vitalnost po odmrznitvi ali CM-1 (kataloška številka 800100 podjetja Cytion), ki vključuje optimizirane osmoprotektante in presnovne stabilizatorje za izboljšanje okrevanja in zmanjšanje stresa, povzročene s kriom.

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

Thawing and Culturing Cells

1. Prepričajte se, da je viala ob dostavi globoko zamrznjena, saj se celice pošiljajo na suhem ledu, da se med prevozom ohranijo optimalne temperature.
2. Po prejemu krioviala takoj shranite pri temperaturi pod $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, da zagotovite ohranitev celične celovitosti, ali pa nadaljujte s korakom 3, če je potrebno takojšnje gojenje.
3. Za takojšnje gojenje vialo hitro odtalite tako, da jo potopite v vodno kopel s čisto vodo in protimikrobnim sredstvom pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter 40-60 sekund nežno mešate, dokler ne ostane majhen ledeni kepica.
4. Vse nadaljnje korake izvajajte v sterilnih pogojih v pretočni nape, pred odprtjem pa kriovial razkužite s 70 % etanolom.
5. Previdno odprite razkuženo vialo in celično suspenzijo prenesite v 15-mililitrsko centrifugirno epruveto, ki vsebuje 8 ml gojišča sobne temperature, ter nežno premešajte.
6. Mešanico centrifugirajte pri $300 \times g$ 3 minute, da ločite celice, in previdno zavržite supernatant, ki vsebuje ostanke zamrzovalnega gojišča.
7. Pelet celic nežno ponovno suspendirajte v 10 ml svežega gojišča. Pri adherentnih celicah suspenzijo razdelite med dve bučki T25; pri suspenzijskih kulturah prenesite vse gojišče v eno bučko T25, da spodbudite učinkovito interakcijo in rast celic.
8. Upoštevajte uveljavljene protokole subkultur za nadaljnjo rast in vzdrževanje celične linije ter tako zagotovite zanesljive rezultate poskusov.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , vlažno ozračje.

Flask Coating

Nič

Freezing Procedure

Kriokonzervirane celične linije se pošiljajo na suhem ledu v potrjeni, izolirani embalaži z zadostno količino hladilnega sredstva, da se med prevozom vzdržuje približno $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ob prejemu takoj preglejte embalažo in vialo nemudoma prenesite v ustrezno skladišče.

Shipping Conditions

Kriokonzervirane celične linije se pošiljajo na suhem ledu v potrjeni, izolirani embalaži z zadostno količino hladilnega sredstva, da se med prevozom vzdržuje približno $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ob prejemu takoj preglejte embalažo in vialo nemudoma prenesite v ustrezno skladišče.

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

Storage Conditions

Za dolgotrajno shranjevanje vial postavite v tekoči dušik v parni fazi pri približno -150 do -196 °C. Shranjevanje pri -80 °C je sprejemljivo le kot kratek vmesni korak pred prenosom v tekoči dušik.

Nadzor kakovosti / Genetski profil / HLA

Sterility

Kontaminacija z mikoplazmo se izključi z uporabo testov na podlagi PCR in metod za odkrivanje mikoplazme na podlagi luminiscence.

Da se zagotovi, da ni kontaminacije z bakterijami, glivami ali kvasovkami, se celične kulture dnevno vizualno pregledujejo.