

Celice U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666**Splošne informacije****Description**

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 je gensko spremenjena človeška osteosarkomna celična linija, pridobljena iz starševskega ozadja U2OS, v kateri je bil endogeni lokus NUP133 spremenjen z uporabo CRISPR/Cas9-posredovanega urejanja genoma, da kodira C-terminalni SNAPf-oznako. NUP133 je osrednja komponenta Y-kompleksa (kompleks NUP107-160), strukturni podkompleks, ki je bistven za sestavo in vzdrževanje jedrskega por kompleksa (NPC). Z uvedbo kodirne sekvence SNAPf v okviru endogenega lokusa se fuzijski protein izraža pod naravnim regulativnim nadzorom, pri čemer se ohranijo fiziološke ravni izražanja in subcelularna lokalizacija.

Oznaka SNAPf je hitro označevalna različica oznake SNAP, inženirano O6-alkilguanin-DNA alkiltransferazo, ki kovalentno reagira s substrati, konjugiranimi z benzilguaninom. To omogoča visoko specifično in vsestransko fluorescenčno označevanje Nup133 v živih ali fiksiranih celicah z uporabo celično prepustnih ali neprepustnih SNAP substratov. V celicah U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 se fuzijski protein lokalizira v jedrski ovojnici v pikastem vzorcu, značilnem za jedrske porne komplekse. Ker se označevanje odvija na endogenem lokusu, sta stehiometrija in arhitektura NPC minimalno moteni, kar naredi ta model primeren za kvantitativno mikroskopijo s super ločljivostjo, sledenje posameznih molekul in kinetične analize sestavljanja in obnove NPC.

Ta celična linija zagotavlja robustno platformo za preučevanje jedrskega transporta, dinamike nukleocitoplazmatskega prometa, biogeneze NPC med interfazo in postmitotičnim ponovnim sestavljanjem jedra ter strukturne organizacije Y-kompleksa znotraj pore. Ozadje U2OS ponuja ravno morfologijo in velika jedra, kar olajšuje slikanje z visoko ločljivostjo. Celice U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 so še posebej primerne za eksperimente označevanja s pulzno-zasledovanjem, korelacijsko svetlobno in elektronsko mikroskopijo ter večbarvne slikanje v kombinaciji z dodatnimi endogeno označenimi nukleoporini ali transportnimi faktorji.

Organism Človek**Tissue** Kost**Disease** Osteosarkom**Metastatic site** Mesto primarnega tumorja (kost)**Applications** Biologija jedrskega pornega kompleksa (NPC); arhitektura kompleksa Nup133/Y; biogeneza NPC; nukleocitoplazmatski transport; mikroskopija s super ločljivostjo (STORM/PALM/STED); sledenje posameznih delcev; označevanje SNAP s pulzno-preganjalo metodo; korelativna svetlobna in elektronska mikroskopija; kvantitativna stehiometrija NPC**Značilnosti****Age** 15 let**Gender** Ženske

Celice U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 | 300666

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

Regulativni podatki

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup133 (kataloška številka Cytion 300666)
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-Nup133) vsebuje fuzijo SNAPf-Nup133, vneseno s CRISPR, ki omogoča fluorescenčno označevanje nukleoporina Nup133. Vstavek je stabilno prisoten. Ta razvrstitev velja samo v Nemčiji in se lahko drugje razlikuje.

Biomolekularni podatki

Protein expression	Nup133, oznaka SNAPf
---------------------------	----------------------

Ravnanje s spletno stranjo

Culture Medium	McCoys 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-Nup133 | 300666

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-Nup133 | 300666

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-Nup133 | 300666

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.