

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

Genel bilgi

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2, U2OS hücrelerinden türetilmiş, genomu düzenlenmiş bir insan osteosarkom hücre hattıdır. Bu hücrelerde, endojen RANBP2 (NUP358 olarak da bilinir) lokusu, CRISPR/Cas9 ile modifiye edilerek, doğal proteinle aynı çerçeve içinde bir SNAPf etiketi kodlayacak şekilde değiştirilmiştir. Nup358/RanBP2, nükleer por kompleksinin (NPC) sitoplazmik filamentlerinde lokalize olan büyük bir nükleoporindir ve nükleositoplazmik taşıma, SUMOilasyon ve mitotik süreçlerde kritik roller oynar. Endojen etiketleme, SNAPf-Nup358'in fizyolojik promotör kontrolü altında eksprese edilmesini sağlayarak, doğal ekspresyon seviyelerini korur ve aşırı ekspresyon sistemleriyle ilişkili artefaktları en aza indirir.

SNAPf etiketi, benzyguinin konjuge substratlara kovalent olarak bağlanan SNAP etiketinin hızlı etiketleme varyantıdır ve canlı veya sabit hücrelerde Nup358'in seçici ve stabil floresan etiketlemesini sağlar. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 hücrelerinde, füzyon proteini, sitoplazmik NPC filamentlerinin karakteristik noktalı dağılımında nükleer zarfta lokalize olur. Bu konfigürasyon, NPC mimarisini ve dinamiklerini incelemek için yüksek çözünürlüklü floresan görüntüleme, süper çözünürlüklü mikroskopi, puls-chase etiketleme ve tek molekül izleme yaklaşımlarını destekler. U2OS hücrelerinin düz morfolojisi ve büyük çekirdekleri, nükleer zarf yapılarının kantitatif görüntülenmesini daha da kolaylaştırır.

Bu model, CRM1/eksportin bağımlı nükleer ihracat, Ran GTPaz döngüsü düzenlemesi ve sitoplazmik taşıma platformlarının uzamsal organizasyonunda Nup358'e özgü rollerin araştırılmasını sağlar. Nup358'in mitotik iğ montajı ve kinetokor fonksiyonuna katılımı göz önüne alındığında, hücre hattı ayrıca mitoz sırasında nükleoporinlerin hücre döngüsüne bağlı yeniden dağılımını ve NPC'nin sökülmesini/yeniden birleştirilmesini incelemek için de uygundur. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2, insan hücrelerinde nükleer gözenek kompleksinin sitoplazmik yüzünün yapısal ve işlevsel yönlerini incelemek için fizyolojik olarak ilgili bir platform sağlar.

Organism

İnsan

Tissue

Kemik

Disease

Osteosarkom

Özellikler

Age

15 yıl

Gender

Kadın

Ethnicity

Kafkas

Morphology

Epitel benzeri

Growth properties

Yapışık

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

Düzenleyici Veriler

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (Cytion katalog numarası 300663)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
Depositor	Ellenberg Laboratuvarı (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Bu insan osteosarkom hücre hattı (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2), nükleer gözenek sitoplazmik fibrillerinin hassas etiketlenmesini sağlayan CRISPR ile tasarlanmış bir SNAPf-Nup358/RanBP2 füzyonu içerir. Modifikasyon kararlı bir şekilde entegre edilmiştir. Bu sınıflandırma sadece Almanya içinde geçerlidir ve başka yerlerde farklılık gösterebilir.

Biyomoleküler Veriler

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

Elleçleme

Culture Medium	McCoy's 5a, w: 3.0 g/L Glukoz, w: stabil Glutamin, w: 2.0 mM Sodyum piruvat, w: 2.2 g/L NaHCO ₃ (Cytion makale numarası 820200a)
Supplements	Ortamı %10 FBS, 3,0 g/L Glukoz, stabil Glutamin, 2,0 mM Sodyum piruvat, 2,2 g/L NaHCO ₃ , %1 NEAA ile takviye edin
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Yapışık hücrelerden eski ortamı çıkarın ve kalsiyum ve magnezyum içermeyen PBS ile yıkayın. T25 şişeleri için 3-5 ml PBS ve T75 şişeleri için 5-10 ml kullanın. Ardından, T25 flasklar için 1-2 ml ve T75 flasklar için 2,5 ml kullanarak hücreleri Accutase ile tamamen kaplayın. Hücreleri ayırmak için oda sıcaklığında 8-10 dakika inkübasyona bırakın. İnkübasyondan sonra, hücreleri yeniden süspansiyon etmek için 10 ml besiyeriyle hafifçe karıştırın, ardından 300xg'de 3 dakika santrifüjleyin. Süpernatantı atın, hücreleri taze besiyerinde yeniden süspansiyon edin ve zaten taze besiyeri içeren yeni şişelere aktarın.
Freeze medium	Kriyoprezervasyon ortamı olarak, yeterli çözülme sonrası canlılık için tam büyüme ortamı (FBS dahil) + %10 DMSO veya iyileşmeyi artırmak ve kriyo-indüklenmiş stresi azaltmak için optimize edilmiş ozmoprotektanlar ve metabolik stabilizatörler içeren CM-1 (Cytion katalog numarası 800100) kullanıyoruz.

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

1. Hücreler taşıma sırasında optimum sıcaklıkları korumak için kuru buz üzerinde gönderildiğinden, flakonun teslimat sırasında derin dondurulmuş halde kaldığını teyit edin.
2. Teslim aldıktan sonra, hücresel bütünlüğün korunmasını sağlamak için kriyovialı hemen -150°C'nin altındaki sıcaklıklarda saklayın veya hemen kültürleme gerekiyorsa 3. adıma geçin.
3. Derhal kültürleme için flakonun temiz su ve antimikrobiyal bir madde içeren 37°C'lik bir su banyosuna daldırıp küçük bir buz kümesi kalana kadar 40-60 saniye boyunca hafifçe çalkalayarak hızlıca çözün.
4. Sonraki tüm adımları steril koşullar altında bir akış başlığı içinde gerçekleştirin ve açmadan önce kriyoviyalleri %70 etanol ile dezenfekte edin.
5. Dezenfekte edilmiş flakonun dikkatlice açın ve hücre süspansiyonunu 8 ml oda sıcaklığında kültür ortamı içeren 15 ml'lik bir santrifüj tüpüne aktarın ve hafifçe karıştırın.
6. Hücreleri ayırmak için karışımı 300 x g'de 3 dakika santrifüjleyin ve artık dondurma ortamı içeren süpernatantı dikkatlice atın.
7. Hücre peletini 10 ml taze kültür ortamında yavaşça yeniden süspansiyon edin. Yapışık hücreler için, süspansiyonu iki T25 kültür şişesi arasında bölün; süspansiyon kültürleri için, etkili hücre etkileşimini ve büyümesini teşvik etmek üzere tüm ortamı tek bir T25 şişesine aktarın.
8. Hücre hattının sürekli büyümesi ve bakımı için belirlenmiş alt kültür protokollerine uyun ve güvenilir deneysel sonuçlar elde edin.

**Incubation
Atmosphere**

37°C, %5_{CO2}, nemlendirilmiş atmosfer.

Flask Coating

Yok

**Freezing
Procedure**

Kriyoprezerve edilmiş hücre hatları, nakliye boyunca yaklaşık -78 °C'yi korumak için yeterli soğutucu akışkan içeren, onaylanmış, yalıtılmış ambalajlarda kuru buz üzerinde gönderilir. Teslim aldığınızda, kabı hemen inceleyin ve flakonları gecikmeden uygun depoya aktarın.

**Shipping
Conditions**

Kriyoprezerve edilmiş hücre hatları, nakliye boyunca yaklaşık -78 °C'yi korumak için yeterli soğutucu akışkan içeren, onaylanmış, yalıtılmış ambalajlarda kuru buz üzerinde gönderilir. Teslim aldığınızda, kabı hemen inceleyin ve flakonları gecikmeden uygun depoya aktarın.

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

Storage Conditions

Uzun süreli muhafaza için flakonları yaklaşık -150 ila -196 °C'de buhar fazlı sıvı nitrojen içine yerleştirin. 80 °C'de saklama yalnızca sıvı nitrojene aktarılmadan önce kısa bir ara adım olarak kabul edilebilir.

Kalite kontrol / Genetik profil / HLA

Sterility

Mikoplazma kontaminasyonu hem PCR tabanlı tahliller hem de lüminesans tabanlı mikoplazma tespit yöntemleri kullanılarak dışlanır.

Bakteriyel, fungal veya maya kontaminasyonu olmadığından emin olmak için hücre kültürleri günlük görsel incelemelere tabi tutulur.