

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

Загальна інформація

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 — це генетично модифікована лінія клітин остеосаркоми людини, отримана з клітин U2OS, в яких ендегенний локус RANBP2 (також відомий як NUP358) був модифікований за допомогою CRISPR/Cas9 для кодування мітки SNAPf в рамці з нативним білком. Nup358/RanBP2 — це великий нуклеопорин, локалізований у цитоплазматичних філаментах ядерно-порового комплексу (NPC) і відіграє важливу роль у ядерно-цитоплазматичному транспорті, SUMO-ілірованні та мітотичних процесах. Ендегенне маркування гарантує, що SNAPf-Nup358 експресується під фізіологічним контролем промотора, підтримуючи нативні рівні експресії та мінімізуючи артефакти, пов'язані з системами надмірної експресії.

Теги SNAPf — це варіант тегів SNAP, що швидко маркують і ковалентно зв'язують субстрати, кон'юговані з бензилгуаніном, що дозволяє селективно і стабільно маркувати Nup358 у живих або фіксованих клітинах. У клітинах U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 фузійний білок локалізується в ядерній оболонці у вигляді точкового розподілу, характерного для цитоплазматичних філаментів NPC. Ця конфігурація підтримує високороздільну флуоресцентну візуалізацію, мікроскопію надвисокої роздільної здатності, мічення методом імпульсного переслідування та відстеження окремих молекул для вивчення архітектури та динаміки NPC. Плоска морфологія та великі ядра клітин U2OS додатково полегшують кількісну візуалізацію структур ядерної оболонки.

Ця модель дозволяє досліджувати специфічні функції Nup358 у CRM1/експортін-залежному ядерному експорті, регуляції циклу Ran GTPase та просторовій організації цитоплазматичних транспортних платформ. З огляду на участь Nup358 у формуванні мітотичного веретена та функції кінетохору, клітинна лінія також підходить для вивчення залежної від клітинного циклу перерозподілу нуклеопоринів та розбирання/повторного складання NPC під час мітозу. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 забезпечує фізіологічно релевантну платформу для аналізу структурних та функціональних аспектів цитоплазматичної поверхні ядерного пористого комплексу в клітинах людини.

Organism	Людина
Tissue	Кость
Disease	Остеосаркома

Характеристики

Age	15 років
Gender	Жінка
Ethnicity	Кавказець
Morphology	Епітеліальноподібні

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

Growth properties Адепт

Нормативні дані

Citation U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (номер за каталогом Cytion 300663)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

Depositor Лабораторія Елленберга (EMBL)

GMO Status ГМО-S1: Ця лінія клітин остеосаркоми людини (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) містить злиття SNAPf-Nup358/RanBP2, сконструйоване за допомогою CRISPR, що дозволяє точно мітити цитоплазматичні фібрили ядерної пори. Модифікація стабільно інтегрована. Ця класифікація діє лише в межах Німеччини і може відрізнятися в інших країнах.

Біомолекулярні дані

Protein expression Nup358/RanBP2, SNAPf-ter

Обробка

Culture Medium McCoys 5a, w: 3,0 г/л Глюкоза, w: стабільна Глютамін, w: 2,0 мМ Піруват натрію, w: 2,2 г/л NaHCO₃ (Cytion article number 820200a)

Supplements Додайте до середовища 10% FBS, 3,0 г/л глюкози, стабільний глютамін, 2,0 мМ пірувату натрію, 2,2 г/л NaHCO₃, 1% NEAA

Dissociation Reagent Аккутаза

Subculturing Видаліть старе середовище з прилиплих клітин і промийте їх PBS, в якому бракує кальцію і магнію. Для колб T25 використовуйте 3-5 мл PBS, а для колб T75 - 5-10 мл. Потім повністю покрийте клітини аккутазою, використовуючи 1-2 мл для колб T25 і 2,5 мл для колб T75. Залиште клітини інкубуватися при кімнатній температурі протягом 8-10 хвилин, щоб відокремити їх. Після інкубації обережно змішайте клітини з 10 мл середовища, щоб ресуспендувати їх, а потім центрифугуйте при 300xg протягом 3 хвилин. Викиньте надосадову рідину, ресуспендуйте клітини у свіжому середовищі та перенесіть їх у нові колби, які вже містять свіже середовище.

Клітини U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663**Freeze medium**

Як середовище криоконсервування ми використовуємо повне живильне середовище (включаючи FBS) + 10% ДМСО для адекватної життєздатності після відтавання або СМ-1 (номер за каталогом Cytion 800100), до складу якого входять оптимізовані осмопротектори та метаболічні стабілізатори для прискорення відновлення та зменшення криоіндукованого стресу.

Thawing and Culturing Cells

1. Переконайтеся, що віал залишається глибоко замороженим після доставки, оскільки клітини транспортуються на сухому льоду для підтримання оптимальної температури під час транспортування.
2. Після отримання негайно зберігайте криовіал при температурі нижче -150°C , щоб забезпечити збереження клітинної цілісності, або перейдіть до кроку 3, якщо потрібне негайне культивування.
3. Для негайного культивування швидко розморозьте віал, зануливши його у водяну баню з чистою водою і антимікробним засобом при температурі 37°C , обережно перемішуючи протягом 40-60 секунд, поки не залишиться невелика крижана грудка.
4. Всі наступні кроки виконуйте в стерильних умовах у проточній витяжній шафі, дезінфікуючи криовіал 70% етанолом перед відкриттям.
5. Обережно відкрийте продезінфікований флакон і перенесіть клітинну суспензію в 15 мл центрифужну пробірку, що містить 8 мл культурального середовища кімнатної температури, обережно перемішуючи.
6. Відцентрифугуйте суміш при $300 \times g$ протягом 3 хвилин, щоб відокремити клітини, і обережно викиньте надосадову рідину, що містить залишки заморожувального середовища.
7. Обережно ресуспендуйте осад клітин у 10 мл свіжого культурального середовища. Для адгезивних клітин розділіть суспензію між двома культуральними колбами T25; для суспензійних культур перенесіть все середовище в одну колбу T25, щоб сприяти ефективній взаємодії та росту клітин.
8. Дотримуйтесь встановлених протоколів субкультивування для продовження росту і підтримання клітинної лінії, забезпечуючи надійні результати експерименту.

Incubation Atmosphere

37°C , 5% CO_2 , волога атмосфера.

Flask Coating

Ні

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

Freezing Procedure

Кріоконсервовані клітинні лінії транспортуються на сухому льоду в перевірній ізольованій упаковці з достатньою кількістю холодоагенту для підтримання температури приблизно -78 °C під час транспортування. При отриманні негайно огляньте контейнер і негайно перемістіть віали у відповідне місце для зберігання.

Shipping Conditions

Кріоконсервовані клітинні лінії транспортуються на сухому льоду в перевірній ізольованій упаковці з достатньою кількістю холодоагенту для підтримання температури приблизно -78 °C під час транспортування. При отриманні негайно огляньте контейнер і негайно перемістіть віали у відповідне місце для зберігання.

Storage Conditions

Для тривалого зберігання помістіть флакони в парофазний рідкий азот при температурі від -150 до -196 °C. Зберігання при -80 °C допустиме лише як короткий проміжний етап перед перенесенням у рідкий азот.

Контроль якості / Генетичний профіль / HLA

Sterility

Зараження мікоплазмою виключається за допомогою аналізів на основі ПЛР та люмінесцентних методів виявлення мікоплазми.

Щоб переконатися у відсутності бактеріального, грибового або дріжджового забруднення, клітинні культури піддаються щоденному візуальному контролю.