

Tế bào U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663

Thông tin chung

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 là dòng tế bào ung thư xương người được chỉnh sửa gen từ dòng tế bào U2OS, trong đó vị trí gen RANBP2 nội sinh (còn được gọi là NUP358) đã được sửa đổi bằng công nghệ CRISPR/Cas9 để mã hóa một thẻ SNAPf nằm trong khung đọc của protein gốc. Nup358/RanBP2 là một nucleoporin lớn được định vị trên các sợi tế bào chất của phức hợp lỗ hạt nhân (NPC) và đóng vai trò quan trọng trong vận chuyển nhân-tế bào chất, SUMO hóa và các quá trình phân bào. Việc gắn thẻ nội sinh đảm bảo rằng SNAPf-Nup358 được biểu hiện dưới sự kiểm soát của promoter sinh lý, duy trì mức biểu hiện tự nhiên và giảm thiểu các hiện tượng bất thường liên quan đến hệ thống biểu hiện quá mức.

Thẻ SNAPf là biến thể gắn nhãn nhanh của thẻ SNAP, có khả năng gắn covalent với các chất nền liên kết benzyguanin, cho phép gắn nhãn huỳnh quang chọn lọc và ổn định trên Nup358 trong tế bào sống hoặc cố định. Trong tế bào U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2, protein liên hợp định vị tại màng nhân với phân bố dạng chấm đặc trưng của các sợi NPC trong tế bào chất. Cấu trúc này hỗ trợ hình ảnh huỳnh quang độ phân giải cao, kính hiển vi siêu phân giải, gắn nhãn theo dõi và theo dõi phân tử đơn để nghiên cứu cấu trúc và động học của NPC. Hình thái phẳng và nhân lớn của tế bào U2OS cũng tạo điều kiện thuận lợi cho việc hình ảnh hóa định lượng các cấu trúc màng nhân.

Mô hình này cho phép nghiên cứu các vai trò cụ thể của Nup358 trong xuất khẩu nhân phụ thuộc CRM1/exportin, điều hòa chu kỳ GTPase của Ran và tổ chức không gian của các nền tảng vận chuyển tế bào chất. Do Nup358 tham gia vào quá trình lắp ráp sợi phân bào và chức năng kinetochore, dòng tế bào này cũng phù hợp để nghiên cứu sự phân bố lại của nucleoporins và quá trình tháo dỡ/lắp ráp lại NPC trong quá trình phân bào. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 cung cấp một nền tảng có ý nghĩa sinh lý để phân tích các khía cạnh cấu trúc và chức năng của mặt tế bào chất của phức hợp lỗ nhân trong tế bào người.

Organism Con người

Tissue Xương

Disease U xương

Metastatic site Vị trí khối u nguyên phát (xương)

Applications Sinh học của các sợi tế bào chất thuộc phức hợp lỗ nhân; Nup358/RanBP2 trong quá trình xuất nhân do CRM1 điều hòa; Chu trình GTPase của Ran; Con đường SUMO; Quá trình hình thành trục phân bào; Theo dõi hạt đơn; Kính hiển vi siêu phân giải; Phương pháp đánh dấu SNAP pulse-chase; Cấu trúc mặt tế bào chất của phức hợp lỗ nhân (NPC)

Đặc điểm

Age 15 năm

Gender Nữ

Tế bào U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663

Ethnicity	Người da trắng
Morphology	Tương tự biểu mô
Cell type	Tế bào biểu mô (u xương ác tính)
Growth properties	Người tuân thủ

Dữ liệu quy định

Citation	U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (Số catalog Cytion 300663)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Chưa được chỉ định (dòng tế bào U2OS biến đổi bằng CRISPR; dòng tế bào gốc U2OS CVCL_0042)
Depositor	Phòng thí nghiệm Ellenberg (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Dòng tế bào ung thư xương người này (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) chứa một protein liên hợp SNAPf-Nup358/RanBP2 được tạo ra bằng công nghệ CRISPR, cho phép đánh dấu chính xác các sợi tế bào chất của lỗ nhân. Sự biến đổi này được tích hợp ổn định. Phân loại này chỉ áp dụng trong phạm vi Đức và có thể khác nhau ở các khu vực khác.

Dữ liệu sinh học phân tử

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

Xử lý

Culture Medium	McCoy's 5a, chứa: 3,0 g/L glucose, chứa: glutamine ổn định, chứa: 2,0 mM natri pyruvate, chứa: 2,2 g/L NaHCO ₃ (Số hiệu sản phẩm Cytion 820200a)
Supplements	Bổ sung vào môi trường nuôi cấy 10% huyết thanh bò (FBS), 3,0 g/L glucose, glutamine ổn định, 2,0 mM natri pyruvate, 2,2 g/L NaHCO ₃ , 1% NEAA
Dissociation Reagent	Accutase

Tế bào U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663**Doubling time** khoảng 24 đến 36 giờ**Subculturing** Loại bỏ môi trường nuôi cấy cũ khỏi các tế bào bám dính và rửa chúng bằng PBS không chứa canxi và magiê. Đối với bình T25, sử dụng 3-5 ml PBS, và đối với bình T75, sử dụng 5-10 ml. Sau đó, phủ hoàn toàn các tế bào bằng Accutase, sử dụng 1-2 ml cho bình T25 và 2,5 ml cho bình T75. Để tế bào ủ ở nhiệt độ phòng trong 8-10 phút để tách chúng ra. Sau khi ủ, nhẹ nhàng trộn tế bào với 10 ml môi trường để tái phân tán chúng, sau đó ly tâm ở 300xg trong 3 phút. Loại bỏ dịch trên, tái phân tán tế bào trong môi trường tươi và chuyển chúng vào các bình mới đã chứa môi trường tươi.**Split ratio** 1 đến 3**Seeding density** 1 đến 3×10^4 tế bào/cm²**Fluid renewal** 2 đến 3 lần mỗi tuần**Freeze medium** Như một môi trường bảo quản đông lạnh, chúng tôi sử dụng môi trường tăng trưởng hoàn chỉnh (bao gồm FBS) + 10% DMSO để đảm bảo độ sống sau khi rã đông, hoặc CM-1 (mã sản phẩm Cytion 800100), bao gồm các chất bảo vệ thẩm thấu và chất ổn định chuyển hóa được tối ưu hóa để nâng cao khả năng phục hồi và giảm stress do đông lạnh gây ra.

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

1. Xác nhận rằng ống nghiệm vẫn được đông lạnh sâu khi giao hàng, vì tế bào được vận chuyển trên đá khô để duy trì nhiệt độ tối ưu trong quá trình vận chuyển.
2. Khi nhận hàng, hãy bảo quản ống nghiệm đông lạnh ngay lập tức ở nhiệt độ dưới -150°C để đảm bảo tính toàn vẹn của tế bào, hoặc tiến hành bước 3 nếu cần nuôi cấy ngay lập tức.
3. Để nuôi cấy ngay lập tức, hãy rã đông ống nghiệm nhanh chóng bằng cách ngâm nó trong bồn nước 37°C với nước sạch và chất kháng khuẩn, khuấy nhẹ trong 40-60 giây cho đến khi còn lại một khối băng nhỏ.
4. Thực hiện tất cả các bước tiếp theo trong điều kiện vô trùng trong tủ hút khí, khử trùng ống cryovial bằng cồn 70% trước khi mở.
5. Mở ống đã khử trùng một cách cẩn thận và chuyển hỗn hợp tế bào vào ống ly tâm 15 ml chứa 8 ml môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ phòng, khuấy nhẹ.
6. Ly tâm hỗn hợp ở $300 \times g$ trong 3 phút để tách tế bào và cẩn thận loại bỏ dịch siêu âm chứa môi trường đông lạnh còn lại.
7. Nhẹ nhàng hòa tan lại khối tế bào trong 10 ml môi trường nuôi cấy tươi. Đối với tế bào bám dính, chia hỗn hợp vào hai bình nuôi cấy T25; đối với tế bào nuôi cấy lơ lửng, chuyển toàn bộ môi trường vào một bình T25 để thúc đẩy tương tác và phát triển tế bào hiệu quả.
8. Tuân thủ các quy trình nuôi cấy con được thiết lập để duy trì sự phát triển và bảo quản dòng tế bào, đảm bảo kết quả thí nghiệm đáng tin cậy.

**Incubation
Atmosphere**

37°C , 5% CO_2 , môi trường ẩm.

Flask Coating

Không có

**Freezing
Procedure**

Các dòng tế bào được bảo quản bằng phương pháp đông lạnh được vận chuyển trên đá khô trong bao bì cách nhiệt đã được kiểm định, kèm theo lượng chất làm lạnh đủ để duy trì nhiệt độ khoảng -78°C trong suốt quá trình vận chuyển. Khi nhận hàng, hãy kiểm tra ngay lập tức bao bì và chuyển các ống nghiệm sang nơi lưu trữ phù hợp mà không chậm trễ.

**Shipping
Conditions**

Các dòng tế bào được bảo quản bằng phương pháp đông lạnh được vận chuyển trên đá khô trong bao bì cách nhiệt đã được kiểm định, kèm theo lượng chất làm lạnh đủ để duy trì nhiệt độ khoảng -78°C trong suốt quá trình vận chuyển. Khi nhận hàng, hãy kiểm tra ngay lập tức bao bì và chuyển các ống nghiệm sang nơi lưu trữ phù hợp mà không chậm trễ.

Tế bào U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 | 300663

Storage Conditions

Để bảo quản lâu dài, hãy đặt ống nghiệm vào nitơ lỏng ở pha hơi ở nhiệt độ khoảng -150 đến -196 °C. Việc bảo quản ở -80 °C chỉ được chấp nhận như một bước trung gian ngắn hạn trước khi chuyển sang nitơ lỏng.

Kiểm soát chất lượng / Hồ sơ di truyền / HLA

Sterility

Sự nhiễm khuẩn Mycoplasma được loại trừ bằng cả các phương pháp xét nghiệm dựa trên PCR và các phương pháp phát hiện Mycoplasma dựa trên phát quang.

Để đảm bảo không có nhiễm khuẩn vi khuẩn, nấm hoặc men, các mẫu nuôi cấy tế bào được kiểm tra trực quan hàng ngày.