U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2

300663

INFORMATIONS GÉNÉRALES

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 est une lignée cellulaire humaine d'ostéosarcome génétiquement modifiée dérivée de cellules U2OS dans laquelle le locus endogène RANBP2 (également connu sous le nom de NUP358) a été modifié par CRISPR/Cas9 pour coder une étiquette SNAPf en phase avec la protéine native. Nup358/RanBP2 est une grande nucléoporine localisée dans les filaments cytoplasmiques du complexe des pores nucléaires (NPC) et joue un rôle essentiel dans le transport nucléocytoplasmique, la SUMOylation et les processus mitotiques. Le marquage endogène garantit que SNAPf-Nup358 est exprimé sous le contrôle physiologique du promoteur, maintenant les niveaux d'expression natifs et minimisant les artefacts associés aux systèmes de surexpression.
Le marqueur SNAPf est une variante à marquage rapide du marqueur SNAP qui se lie de manière covalente aux substrats conjugués à la benzylguanine, permettant un marquage fluorescent sélectif et stable de Nup358 dans des cellules vivantes ou fixées. Dans les cellules U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2, la protéine de fusion se localise dans l'enveloppe nucléaire selon une distribution ponctuelle caractéristique des filaments NPC cytoplasmiques. Cette configuration permet l'imagerie par fluorescence à haute résolution, la microscopie à super-résolution, le marquage par pulse-chase et le suivi de molécules individuelles pour étudier l'architecture et la dynamique des NPC. La morphologie plate et les grands noyaux des cellules U2OS facilitent encore davantage l'imagerie quantitative des structures de l'enveloppe nucléaire.
Ce modèle permet d'étudier les rôles spécifiques de Nup358 dans l'export nucléaire dépendant de CRM1/exportine, la régulation du cycle de la GTPase Ran et l'organisation spatiale des plateformes de transport cytoplasmiques. Compte tenu de l'implication de Nup358 dans l'assemblage du fuseau mitotique et la fonction kinétochore, la lignée cellulaire est également adaptée à l'étude de la redistribution des nucléoporines dépendante du cycle cellulaire et du désassemblage/réassemblage des NPC pendant la mitose. U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 fournit une plateforme physiologiquement pertinente pour disséquer les aspects structurels et fonctionnels de la face cytoplasmique du complexe des pores nucléaires dans les cellules humaines.

Tissu	Os
Maladie	Ostéosarcome
Site métastatique	Localisation de la tumeur primaire (os)

Applications

Biologie des filaments cytoplasmiques du complexe des pores nucléaires ; rôle de Nup358/RanBP2 dans l'export nucléaire médié par CRM1 ; cycle de la GTPase Ran ; voie SUMO ; assemblage du fuseau mitotique ; suivi de particules individuelles ; microscopie à super-résolution ; marquage SNAP par impulsion-poursuite ; architecture de la face cytoplasmique du NPC

CLASSIFICATION

Organisme	Humain
Sexe	Femme
Propriétés de croissance	Adepte
Statut OGM	GMO-S1

Informations détaillées sur le statut OGM

GMO-S1: This human osteosarcoma cell line (U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2) contains a CRISPR-engineered SNAPf-Nup358/RanBP2 fusion enabling precise labeling of nuclear pore cytoplasmic fibrils. The modification is stably integrated. This classification applies only within Germany and may differ elsewhere.

Niveau de biosécurité	1

Cytion GmbH
Nikola-Tesla-Str. 3
69124 Heidelberg
Tel: +49 (0)6221 405780
info@cytion.com
cytion.com

Registered office Heidelberg
VAT ID: DE283292917
Local court Mannheim - HRB 714394
CEO / Geschäftsführer: Jonathan Steubing

Banking information
Sparkasse Heidelberg
IBAN: DE35 6725 0020 0009 2076 86
BIC: SOLADES1HDB

CARACTÉRISTIQUES

Morphologie	De type épithélial
Type de cellule	Cellules épithéliales (ostéosarcome)
Temps de doublement	environ 24 à 36 heures

IDENTIFIANTS

Référence

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (numéro de catalogue Cytion 300663)

Numéro d'identification fiscale NCBI	9606
Cellosaurus	Not assigned (CRISPR-modified U2OS derivative; parental U2OS CVCL_0042)
Déposant	Le laboratoire Ellenberg (EMBL)

EXPRESSION ET SENSIBILITÉ

Expression des protéines

Nup358/RanBP2, SNAPf-tag

MANIPULATION ET CULTURE

Milieu de culture

McCoys 5a, w : 3.0 g/L Glucose, w : Glutamine stable, w : 2.0 mM Pyruvate de sodium, w : 2.2 g/L NaHCO3 (numéro d'article Cytion 820200a)

Atmosphère d'incubation	37°C, 5%CO2, atmosphère humidifiée.

Compléments alimentaires

Compléter le milieu avec 10 % de FBS, 3,0 g/L de glucose, de la glutamine stable, 2,0 mM de pyruvate de sodium, 2,2 g/L de NaHCO3, 1 % de NEAA

Réactif de dissociation	Accutase

Repiquage

Retirer l'ancien milieu des cellules adhérentes et les laver avec du PBS dépourvu de calcium et de magnésium. Pour les flacons T25, utiliser 3-5 ml de PBS, et pour les flacons T75, 5-10 ml. Ensuite, recouvrir complètement les cellules avec Accutase, en utilisant 1 à 2 ml pour les flacons T25 et 2,5 ml pour les flacons T75. Laisser les cellules incuber à température ambiante pendant 8-10 minutes pour les détacher. Après incubation, mélanger délicatement les cellules avec 10 ml de milieu pour les remettre en suspension, puis centrifuger à 300xg pendant 3 minutes. Jeter le surnageant, remettre les cellules en suspension dans du milieu frais et les transférer dans de nouveaux flacons contenant déjà du milieu frais.

Rapport de fractionnement	1 à 3
Densité de semis	1 à 3 × 10^4 cellules/cm^2
Renouvellement des fluides	2 à 3 fois par semaine

Cytion GmbH
Nikola-Tesla-Str. 3
69124 Heidelberg
Tel: +49 (0)6221 405780
info@cytion.com
cytion.com

Registered office Heidelberg
VAT ID: DE283292917
Local court Mannheim - HRB 714394
CEO / Geschäftsführer: Jonathan Steubing

Banking information
Sparkasse Heidelberg
IBAN: DE35 6725 0020 0009 2076 86
BIC: SOLADES1HDB

Décongélation et mise en culture

Confirm that the vial remains deeply frozen upon delivery, as cells are shipped on dry ice to maintain optimal temperatures during transit.
Upon receipt, either store the cryovial immediately at temperatures below -150°C to ensure the preservation of cellular integrity, or proceed to step 3 if immediate culturing is required.
For immediate culturing, swiftly thaw the vial by immersing it in a 37°C water bath with clean water and an antimicrobial agent, agitating gently for 40-60 seconds until a small ice clump remains.
Perform all subsequent steps under sterile conditions in a flow hood, disinfecting the cryovial with 70% ethanol before opening.
Carefully open the disinfected vial and transfer the cell suspension into a 15 ml centrifuge tube containing 8 ml of room-temperature culture medium, mixing gently.
Centrifuge the mixture at 300 x g for 3 minutes to separate the cells and carefully discard the supernatant containing residual freezing medium.
Gently resuspend the cell pellet in 10 ml of fresh culture medium. For adherent cells, divide the suspension between two T25 culture flasks; for suspension cultures, transfer all the medium into one T25 flask to promote effective cell interaction and growth.
Adhere to established subculture protocols for continued growth and maintenance of the cell line, ensuring reliable experimental outcomes.

CONTRÔLE QUALITÉ ET CRYOCONSERVATION

Stérilité

La contamination par les mycoplasmes est exclue à l'aide de tests basés sur la PCR et de méthodes de détection des mycoplasmes basées sur la luminescence.
Pour s'assurer de l'absence de contamination bactérienne, fongique ou levurienne, les cultures cellulaires font l'objet d'inspections visuelles quotidiennes.

Milieu de congélation	Comme milieu de cryoconservation, nous utilisons un milieu de croissance complet (comprenant du FBS) + 10 % de DMSO pour une viabilité adéquate après décongélation, ou CM-1 (numéro de catalogue 800100 de Cytion), qui comprend des osmoprotectants et des stabilisateurs métaboliques optimisés pour améliorer la récupération et réduire le stress induit par la cryogénisation.

Conditions de stockage

Pour une conservation à long terme, placer les flacons dans de l'azote liquide en phase vapeur à une température comprise entre -150 et -196 °C environ. Le stockage à -80 °C n'est acceptable qu'en tant qu'étape intermédiaire de courte durée avant le transfert dans l'azote liquide.

Conditions de livraison

Les lignées cellulaires cryoconservées sont expédiées sur glace sèche dans des emballages isolés et validés, avec suffisamment de réfrigérant pour maintenir une température d'environ -78 °C tout au long du transport. À la réception, inspecter immédiatement le conteneur et transférer sans délai les flacons dans un lieu de stockage approprié.

DONATEUR

Âge du donneur	15 ans
Origine ethnique	Caucasien

ASPECTS JURIDIQUES ET SÉCURITÉ

Consignes de sécurité

Lorsque l'on envisage de stocker un cryovial dans l'azote liquide en vue d'une décongélation ultérieure, il est obligatoire de respecter des mesures de sécurité rigoureuses. Des gants et des vêtements de protection appropriés sont indispensables, et l'utilisation d'un masque facial ou de lunettes de sécurité est requise pendant le transfert des échantillons congelés vers ou depuis le réservoir d'azote liquide. Ceci afin de réduire le risque de blessures dues à l'explosion potentielle des cryoviaux lors de leur retrait, qui peut entraîner la projection de fragments tranchants.

Garantie

Chez Cytion, nous nous portons garants de la qualité et de la viabilité de nos produits.
Nous garantissons que nos cellules seront viables au début de la culture pendant 60 jours après l'expédition de nos installations.
Nous assurons que tous les matériaux sont conformes aux spécifications décrites dans le certificat d'analyse et/ou la fiche produit
Pour plus de détails, veuillez consulter notre <a href=""/Who-we-are/Warranty/"" hreflang=""x-default""> Déclaration de garantie

Les accords conclus avec des tiers s'appliquent	Yes