U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2

300663

GENERAL INFORMATION

Description

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 é uma linhagem celular de osteossarcoma humano com edição genômica, derivada de células U2OS, na qual o locus endógeno RANBP2 (também conhecido como NUP358) foi modificado por CRISPR/Cas9 para codificar uma etiqueta SNAPf em fase com a proteína nativa. A Nup358/RanBP2 é uma grande nucleoporina localizada nos filamentos citoplasmáticos do complexo de poros nucleares (NPC) e desempenha papéis críticos no transporte nucleocitoplasmático, na SUMOilação e nos processos mitóticos. A marcação endógena garante que o SNAPf-Nup358 seja expresso sob o controle de um promotor fisiológico, mantendo os níveis de expressão nativos e minimizando artefatos associados a sistemas de superexpressão.
A etiqueta SNAPf é uma variante de marcação rápida da etiqueta SNAP que se liga covalentemente a substratos conjugados com benzilguanina, permitindo a marcação fluorescente seletiva e estável de Nup358 em células vivas ou fixadas. Nas células U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2, a proteína de fusão se localiza no envelope nuclear em uma distribuição pontilhada característica dos filamentos citoplasmáticos do NPC. Essa configuração permite o uso de imagens de fluorescência de alta resolução, microscopia de super-resolução, marcação por pulso-perseguição e técnicas de rastreamento de moléculas individuais para estudar a arquitetura e a dinâmica do NPC. A morfologia achatada e os núcleos grandes das células U2OS facilitam ainda mais a obtenção de imagens quantitativas das estruturas do envelope nuclear.
Esse modelo permite a investigação das funções específicas da Nup358 na exportação nuclear dependente de CRM1/exportina, na regulação do ciclo da GTPase Ran e na organização espacial das plataformas de transporte citoplasmático. Dado o envolvimento da Nup358 na montagem do fuso mitótico e na função do cinetocoro, a linhagem celular também é adequada para o estudo da redistribuição das nucleoporinas dependente do ciclo celular e da desmontagem/remontagem do NPC durante a mitose. A U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 oferece uma plataforma fisiologicamente relevante para a análise dos aspectos estruturais e funcionais da face citoplasmática do complexo de poros nucleares em células humanas.

Tissue	Osso
Disease	Osteossarcoma
Metastatic site	Localização do tumor primário (osso)

Applications

Biologia dos filamentos citoplasmáticos do complexo de poros nucleares; Nup358/RanBP2 na exportação nuclear mediada por CRM1; ciclo da GTPase Ran; via SUMO; montagem do fuso mitótico; rastreamento de partícula única; microscopia de super-resolução; marcação por pulso-perseguição com SNAP; arquitetura da face citoplasmática do NPC

CLASSIFICATION

Organism	Human
Sex	Female
Growth properties	Adherent
GMO status	GMO-S1

GMO status details

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.

Biosafety level	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

CHARACTERISTICS

Morphology	De tipo epitelial
Cell type	Células epiteliais (osteossarcoma)
Doubling time	aproximadamente 24 a 36 horas

IDENTIFIERS

Citation

U2OS-CRISPR-SNAPf-Nup358/RanBP2 (número de catálogo da Cytion 300663)

NCBI TaxID	9606
Cellosaurus	Not assigned (CRISPR-modified U2OS derivative; parental U2OS CVCL_0042)
Depositor	Laboratório Ellenberg (EMBL)

EXPRESSION AND SUSCEPTIBILITY

Protein expression

Nup358/RanBP2, SNAPf-tag

HANDLING AND CULTURE

Culture medium

McCoys 5a, p: 3,0 g/L de glicose, p: glutamina estável, p: 2,0 mM de piruvato de sódio, p: 2,2 g/L de $NaHCO_3$ (número de artigo da Cytion 820200a)

Incubation atmosphere	37 °C, 5% de CO_2, atmosfera umidificada.

Supplements

Adicione ao meio 10% de FBS, 3,0 g/L de glicose, glutamina estável, 2,0 mM de piruvato de sódio, 2,2 g/L de $NaHCO_3$ e 1% de NEAA

Dissociation reagent	Accutase

Subculturing

Remova o meio antigo das células aderentes e lave-as com PBS sem cálcio nem magnésio. Para frascos T25, use 3 a 5 ml de PBS; para frascos T75, use 5 a 10 ml. Em seguida, cubra as células completamente com Accutase, utilizando 1 a 2 ml para frascos T25 e 2,5 ml para frascos T75. Deixe as células incubarem à temperatura ambiente por 8 a 10 minutos para que se desprendam. Após a incubação, misture delicadamente as células com 10 ml de meio para ressuspender, depois centrifugue a 300xg por 3 minutos. Descarte o sobrenadante, ressuspenda as células em meio fresco e transfira-as para novos frascos que já contenham meio fresco.

Split ratio	1 a 3
Seeding density	1 a 3 × 10^4 células/cm^2
Fluid renewal	2 a 3 vezes por semana

Thawing and culturing

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.

QUALITY CONTROL AND CRYOPRESERVATION

Sterility

A contaminação por micoplasma é descartada por meio de ensaios baseados em PCR e de métodos de detecção de micoplasma baseados em luminescência.
Para garantir que não haja contaminação por bactérias, fungos ou leveduras, as culturas celulares são submetidas a inspeções visuais diárias.

Freeze medium	Como meio de criopreservação, utilizamos meio de crescimento completo (incluindo FBS) + 10% de DMSO para garantir viabilidade adequada após o descongelamento, ou CM-1 (número de catálogo da Cytion 800100), que inclui osmoprotetores e estabilizadores metabólicos otimizados para melhorar a recuperação e reduzir o estresse induzido pela criopreservação.

Storage conditions

Para preservação a longo prazo, coloque os frascos em nitrogênio líquido em fase de vapor a uma temperatura entre aproximadamente −150 e −196 °C. O armazenamento a −80 °C é aceitável apenas como uma etapa intermediária de curta duração antes da transferência para o nitrogênio líquido.

Shipping conditions

As linhagens celulares criopreservadas são enviadas em gelo seco, em embalagens isoladas e validadas, com refrigerante suficiente para manter a temperatura em aproximadamente −78 °C durante todo o transporte. Ao receber a remessa, inspecione o recipiente imediatamente e transfira os frascos sem demora para o local de armazenamento adequado.

DONOR

Donor age	15 anos
Ethnicity	caucasiano

LEGAL AND SAFETY

Safety precautions

Ao planejar o armazenamento de um criotubo em nitrogênio líquido para descongelamento futuro, é obrigatório seguir medidas de segurança rigorosas. É essencial o uso de luvas e roupas de proteção adequadas, além do uso obrigatório de máscara facial ou óculos de proteção durante a transferência de amostras congeladas para dentro ou para fora do tanque de nitrogênio líquido. Isso visa mitigar o risco de ferimentos decorrentes de possíveis explosões dos criotubos durante a remoção, o que pode resultar na projeção de fragmentos pontiagudos.

Warranty

Na Cytion, garantimos a qualidade e a viabilidade de nossos produtos.
Garantimos que nossas células permanecerão viáveis no início da cultura por
60 dias após o envio de nossas instalações.
Asseguramos que todos os materiais estão em conformidade com as especificações descritas no
Certificado de Análise e/ou na Ficha Técnica do Produto.
Para obter todos os detalhes, consulte nossa
Declaração de Garantia.

Third-party agreements apply	Yes