Product sheet

Клетки U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Обща информация

Description	U2OS-CRISPR-TPR-SNAP е геномно редактирана човешка остеосаркомна клетъчна линия, получена от U2OS клетки, в които ендогенният TPR (Translocated Promoter Region) ген е модифициран с помощта на CRISPR/Cas9 технология, за да кодира SNAP таг в рамката. TPR е голям спираловиден нуклеопорин, който се локализира в ядрената кошница от нуклеоплазмената страна на ядрения порен комплекс (NPC). Чрез маркиране на TPR в ендогенния му локус, фузионният протеин се експресира под естествен регулаторен контрол, запазвайки физиологичните нива на експресия и поддържайки правилното вграждане в структурата на ядрената кошница. SNAP тагът позволява ковалентно маркиране на TPR с бензилгуанин-конюгирани флуоресцентни субстрати в живи или фиксирани клетки, което позволява високоспецифична и стабилна визуализация. В U2OS-CRISPR-TPR-SNAP клетки маркираният TPR показва характерно точково разпределение, подобно на пръстен, в ядрената мембрана, съответстващо на NPC-асоциираните структури на ядрената кошница. Тази система е подходяща за количествена флуоресцентна микроскопия, изображения със суперразделителна способност, маркиране с импулсно проследяване и динамични изследвания на сглобяването и обновяването на ядрената кошница. Плоската морфология и големите ядра на U2OS клетките улесняват изображенията с висока разделителна способност на структурите, свързани с ядрената мембрана. TPR играе критична роля в износа на мРНК, регулирането на ядрения транспорт, организацията на хроматина в периферията на ядрото и пространствената организация на генома. TPR също така участва в образуването на подкомпартаменти, свързани с ядрения транспорт, и в изключването на хетерохроматина от областите, свързани с ядрените пори. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP предоставя физиологично релевантен модел за разлагане на архитектурата и динамиката на ядрената кошница, изследване на механизмите на ядрено-цитоплазмен транспорт и изучаване на взаимодействията на хроматина, свързани с ядрената мембрана, при ендогенни условия на експресия.
Organism	Човек
Tissue	Bone
Disease	Остеосарком

Характеристики

Age	15 години
Gender	Жена
Ethnicity	Кавказки
Morphology	Подобни на епител

Клетки U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Growth properties	Придържащи се

Регулаторни данни

Citation	U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (каталожен номер 300667 на Cytion)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
Depositor	Лабораторията на Елънбърг (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Тази човешка клетъчна линия на остеосарком (U2OS-CRISPR-TPR-SNAP) съдържа синтез на TPR-SNAP, създаден по метода CRISPR, който позволява флуоресцентно и химическо маркиране на протеина на ядрената кошница TPR. Конструкцията е стабилно интегрирана. Тази класификация се прилага само в Германия и може да се различава в други страни.

Биомолекулярни данни

Protein expression	TPR, SNAP-таг

Работа с

Culture Medium	McCoys 5a, w: 3,0 g/L глюкоза, w: стабилен глутамин, w: 2,0 mM натриев пируват, w: 2,2 g/L NaHCO3 (номер на статията в Cytion 820200a)
Supplements	Допълнете средата с 10% FBS, 3,0 g/L глюкоза, стабилен глутамин, 2,0 mM натриев пируват, 2,2 g/L NaHCO3, 1% NEAA
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Отстранете старата среда от адхезивните клетки и ги промийте с PBS, която не съдържа калций и магнезий. За колби T25 използвайте 3-5 ml PBS, а за колби T75 - 5-10 ml. След това покрийте клетките изцяло с Accutase, като използвате 1-2 ml за колби T25 и 2,5 ml за колби T75. Оставете клетките да се инкубират на стайна температура за 8-10 минути, за да се отделят. След инкубацията внимателно разбъркайте клетките с 10 ml среда, за да ги ресуспендирате, след което центрофугирайте при 300xg за 3 минути. Изхвърлете супернатантата, ресуспендирайте клетките в прясна среда и ги прехвърлете в нови колби, които вече съдържат прясна среда.

Клетки U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Freeze medium	Като среда за криоконсервация използваме пълна среда за растеж (включително FBS) + 10% DMSO за адекватна жизнеспособност след размразяване или CM-1 (каталожен номер 800100 на Cytion), която включва оптимизирани осмопротектори и метаболитни стабилизатори за подобряване на възстановяването и намаляване на криоиндуцирания стрес.

Thawing and Culturing Cells

1. Уверете се, че флаконът остава дълбоко замразен при доставката, тъй като клетките се транспортират със сух лед, за да се поддържат оптимални температури по време на транспортирането.

2. При получаване или съхранявайте незабавно криовиолата при температури под -150 °C, за да осигурите запазване на клетъчната цялост, или преминете към стъпка 3, ако е необходимо незабавно култивиране.

3. За незабавно култивиране бързо размразете флакона, като го потопите във водна баня с чиста вода и антимикробен агент с температура 37 °C, като разбърквате внимателно в продължение на 40-60 секунди, докато остане малка ледена бучка.

4. Извършвайте всички следващи стъпки при стерилни условия в аспиратор, като преди отваряне дезинфекцирате криовиолата със 70% етанол.

5. Внимателно отворете дезинфекцирания флакон и прехвърлете клетъчната суспензия в 15 ml центрофужна епруветка, съдържаща 8 ml хранителна среда със стайна температура, като разбъркате внимателно.

6. Центрофугирайте сместа при 300 x g в продължение на 3 минути, за да отделите клетките, и внимателно изхвърлете супернатантата, съдържаща остатъчна замразяваща среда.

7. Внимателно ресуспендирайте клетъчната пелета в 10 ml прясна хранителна среда. За адхезивни клетки разделете суспензията между две колби T25; за суспензионни култури прехвърлете цялата среда в една колба T25, за да стимулирате ефективното взаимодействие и растеж на клетките.

8. Придържайте се към установените протоколи за субкултивиране за непрекъснат растеж и поддържане на клетъчната линия, като гарантирате надеждни експериментални резултати.

Incubation Atmosphere	37°C, 5%$_{CO2}$, овлажнена атмосфера.

Flask Coating

За оптимално прикрепване и жизнеспособност след размразяване препоръчваме да се използват **колби или плаки с колагеново покритие**.

Клетки U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Freezing Procedure	Криоконсервираните клетъчни линии се транспортират върху сух лед във валидирана, изолирана опаковка с достатъчно хладилен агент, за да се поддържа приблизително -78 °C по време на транспортирането. При получаването незабавно прегледайте опаковката и незабавно прехвърлете флаконите за подходящо съхранение.
Shipping Conditions	Криоконсервираните клетъчни линии се транспортират върху сух лед във валидирана, изолирана опаковка с достатъчно хладилен агент, за да се поддържа приблизително -78 °C по време на транспортирането. При получаването незабавно прегледайте опаковката и незабавно прехвърлете флаконите за подходящо съхранение.
Storage Conditions	За дълготрайно съхранение поставете флаконите в течен азот в парна фаза при температура около -150 до -196 °C. Съхранението при -80 °C е приемливо само като кратък междинен етап преди прехвърлянето в течен азот.

Контрол на качеството / Генетичен профил / HLA

Sterility	Замърсяването с микоплазма се изключва както чрез PCR-базирани анализи, така и чрез луминесцентни методи за откриване на микоплазма. За да се гарантира, че няма бактериално, гъбично или дрождево замърсяване, клетъчните култури се подлагат на ежедневни визуални проверки.