

Buňky U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Obecné informace

Description

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP je genomově upravená lidská osteosarkomová buněčná linie odvozená z buněk U2OS, ve které byl endogenní gen TPR (Translocated Promoter Region) modifikován pomocí technologie CRISPR/Cas9 tak, aby kódoval in-frame SNAP tag. TPR je velký nukleoporin s vinutou strukturou, který se lokalizuje do jaderného koše na nukleoplazmatické straně jaderného pórového komplexu (NPC). Označením TPR v jeho endogenním lokusu se fúzní protein exprimuje pod nativní regulační kontrolou, čímž se zachovávají fyziologické úrovně exprese a udržuje se správné začlenění do struktury jaderného koše.

SNAP tag umožňuje kovalentní značení TPR fluorescenčními substráty konjugovanými s benzyguaninem v živých nebo fixovaných buňkách, což umožňuje vysoce specifickou a stabilní vizualizaci. V buňkách U2OS-CRISPR-TPR-SNAP vykazuje značený TPR charakteristické tečkovité prstencové rozložení na jaderné obálce, které odpovídá strukturám jaderného koše asociovaných s NPC. Tento systém je vhodný pro kvantitativní fluorescenční mikroskopii, superrozlišovací zobrazování, značení pulzním sledováním a dynamické studie sestavování a obměny jaderného koše. Plochá morfologie a velká jádra buněk U2OS usnadňují vysokorozlišovací zobrazování struktur asociovaných s jadernou obálkou.

TPR hraje klíčovou roli v exportu mRNA, regulaci jaderného transportu, organizaci chromatinu na jaderném okraji a prostorové organizaci genomu. TPR se také podílí na tvorbě subkompartmentů souvisejících s jaderným transportem a na vyloučení heterochromatinu z oblastí spojených s jadernými póry. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP poskytuje fyziologicky relevantní model pro rozbor architektury a dynamiky jaderného košíku, zkoumání mechanismů nukleocytoplazmatického transportu a studium interakcí chromatinu spojených s jadernou membránou za endogenních expresních podmínek.

Organism

Člověk

Tissue

Kost

Disease

Osteosarkom

Metastatic site

Místo primárního nádoru (kost)

Applications

Biologie jaderného koše; export mRNA zprostředkovaný TPR; regulace transportu mezi jádrem a cytoplazmou; organizace chromatinu na okraji jádra; subkompartmenty jaderného transportu; prostorová organizace genomu; mikroskopie se superrozlišením; značení metodou SNAP pulse-chase; vyloučení heterochromatinu z oblastí spojených s póry

Charakteristika

Age

15 let

Gender

Ženy

Ethnicity

Kavkazský

Buňky U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667**Morphology** Epitelu podobné**Cell type** Epitelové buňky (osteosarkom)**Growth properties** Adherentní**Regulační údaje****Citation** U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (katalogové číslo Cytion 300667)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** Není přiřazeno (derivát U2OS modifikovaný pomocí CRISPR; rodičovská linie U2OS CVCL_0042)**Depositor** Ellenbergova laboratoř (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Tato lidská buněčná linie osteosarkomu (U2OS-CRISPR-TPR-SNAP) obsahuje fúzi TPR-SNAP vytvořenou technologií CRISPR, která umožňuje fluorescenční a chemické značení proteinu jaderného koše TPR. Konstrukt je stabilně integrován. Tato klasifikace platí pouze v Německu a jinde se může lišit.**Biomolekulární data****Protein expression** TPR, SNAP-tag**Zpracování****Culture Medium** McCoy's 5a, w: 3,0 g/l glukóza, w: stabilní glutamin, w: 2,0 mM pyruvát sodný, w: 2,2 g/l NaHCO₃ (číslo článku Cytion 820200a)**Supplements** Doplněte médium o 10% FBS, 3,0 g/l glukózy, stabilní glutamin, 2,0 mM pyruvát sodný, 2,2 g/l NaHCO₃, 1% NEAA**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** přibližně 24 až 36 hodin

Buňky U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Subculturing Odstraňte staré médium z adherovaných buněk a promyjte je PBS bez vápníku a hořčíku. Pro baňky T25 použijte 3-5 ml PBS a pro baňky T75 5-10 ml. Poté buňky zcela zakryjte přípravkem Accutase, přičemž použijte 1-2 ml pro baňky T25 a 2,5 ml pro baňky T75. Nechte buňky inkubovat při pokojové teplotě po dobu 8-10 minut, aby se oddělily. Po inkubaci jemně promíchejte buňky s 10 ml média, aby byly znovu suspendovány, a poté je odstředte při 300xg po dobu 3 minut. Supernatant vyhodte, buňky znovu rozpustte v čerstvém médiu a přeneste je do nových baněk, které již obsahují čerstvé médium.

Split ratio 1 až 3

Seeding density 1 až 3×10^4 buněk/cm²

Fluid renewal 2 až 3krát týdně

Freeze medium Jako kryokonzervační médium používáme kompletní růstové médium (včetně FBS) + 10 % DMSO pro zajištění dostatečné životaschopnosti po rozmrazení nebo CM-1 (katalogové číslo 800100 společnosti Cytion), které obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory pro zlepšení regenerace a snížení stresu způsobeného kryem.

Buňky U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667**Thawing and
Culturing Cells**

1. Ověřte si, že lahvička zůstane při dodání hluboce zmrazená, protože buňky se přepravují na suchém ledu, aby se během přepravy udržely optimální teploty.
2. Po obdržení kryovialku buď okamžitě uložte při teplotě nižší než -150 °C, abyste zajistili zachování buněčné integrity, nebo přejděte ke kroku 3, pokud je nutná okamžitá kultivace.
3. Pro okamžitou kultivaci rychle rozmrazte lahvičku ponořením do vodní lázně o teplotě 37 °C s čistou vodou a antimikrobiálním prostředkem a jemně ji míchejte po dobu 40-60 sekund, dokud nezůstane malý ledový chuchvalec.
4. Všechny další kroky provádějte za sterilních podmínek v průtokové digestoři a před otevřením kryovialku dezinfikujte 70% ethanolem.
5. Opatrně otevřete dezinfikovanou lahvičku a přeneste buněčnou suspenzi do 15 ml centrifugační zkumavky obsahující 8 ml kultivačního média o pokojové teplotě a jemně promíchejte.
6. Směs odstředujte při 300 x g po dobu 3 minut, aby se buňky oddělily, a supernatant obsahující zbytky mrazicího média opatrně zlikvidujte.
7. Pelety buněk jemně resuspendujte v 10 ml čerstvého kultivačního média. U adherentních buněk rozdělte suspenzi mezi dvě kultivační baňky T25; u suspenzních kultur přeneste veškeré médium do jedné baňky T25, abyste podpořili účinnou interakci a růst buněk.
8. Dodržujte zavedené subkultivační protokoly pro kontinuální růst a udržování buněčné linie, čímž zajistíte spolehlivé výsledky experimentů.

**Incubation
Atmosphere**

37 °C, 5 % CO_2 , zvlhčená atmosféra.

Flask Coating

Žádný

**Freezing
Procedure**

Kryokonzervované buněčné linie se přepravují na suchém ledu v ověřených, izolovaných obalech s dostatečným množstvím chladiva, aby se po celou dobu přepravy udržovala teplota přibližně -78 °C. Po obdržení ihned zkontrolujte obal a neprodleně přeneste lahvičky do vhodného skladu.

**Shipping
Conditions**

Kryokonzervované buněčné linie se přepravují na suchém ledu v ověřených, izolovaných obalech s dostatečným množstvím chladiva, aby se po celou dobu přepravy udržovala teplota přibližně -78 °C. Po obdržení ihned zkontrolujte obal a neprodleně přeneste lahvičky do vhodného skladu.

Buňky U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Storage Conditions

Pro dlouhodobé uchování umístěte lahvičky do kapalného dusíku v plynné fázi při teplotě přibližně -150 až -196 °C. Skladování při -80 °C je přijatelné pouze jako krátký přechodný krok před přemístěním do kapalného dusíku.

Kontrola kvality / Genetický profil / HLA

Sterility

Kontaminace mykoplazmaty je vyloučena jak pomocí testů založených na PCR, tak pomocí luminiscenčních metod detekce mykoplazmy.

Aby se zajistilo, že nedojde ke kontaminaci bakteriemi, plísněmi nebo kvasinkami, jsou buněčné kultury denně podrobovány vizuálním kontrolám.