

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-celler | 300667**Generel information****Description**

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP er en genomredigeret human osteosarkomcellelinje afledt af U2OS-celler, hvor det endogene TPR-gen (Translocated Promoter Region) er blevet modificeret ved hjælp af CRISPR/Cas9-teknologi til at kode for et in-frame SNAP-tag. TPR er et stort coiled-coil-nukleoporin, der lokaliseres til nuklearkurven på den nukleoplasmatiske side af nuklearporekomplekset (NPC). Ved at mærke TPR på dets endogene locus udtrykkes fusionsproteinet under naturlig regulatorisk kontrol, hvilket bevarer fysiologiske ekspressionsniveauer og opretholder korrekt inkorporering i nuklearkurvstrukturen.

SNAP-tagget muliggør kovalent mærkning af TPR med benzylguanin-konjugerede fluorescerende substrater i levende eller fiksede celler, hvilket giver mulighed for højt specifik og stabil visualisering. I U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-celler viser mærket TPR en karakteristisk punktformet ringlignende fordeling ved kernehinden, svarende til NPC-associerede nukleare kurvstrukturer. Dette system er velegnet til kvantitativ fluorescensmikroskopi, superopløsningsbilleddannelse, puls-chase-mærkning og dynamiske studier af nuklear kurvsamling og omsætning. Den flade morfologi og de store kerner i U2OS-celler letter højopløsningsbilleddannelse af kernehindeassocierede strukturer.

TPR spiller en afgørende rolle i mRNA-eksport, regulering af nuklear transport, kromatinorganisation ved kerneperiferien og rumlig genomorganisation. TPR er også impliceret i dannelsen af nukleare transportrelaterede underkompartimenter og i udelukkelsen af heterokromatin fra nukleare pore-associerede regioner. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP udgør en fysiologisk relevant model til at analysere nukleare kurves arkitektur og dynamik, undersøge nukleocytoplasmatiske transportmekanismer og studere nukleare membranrelaterede kromatininteraktioner under endogene ekspressionsbetingelser.

Organism

Menneske

Tissue

Knogle

Disease

Osteosarkom

Metastatic site

Primær tumorlokalisering (knogle)

Applications

Kernekurvbiologi; TPR-medieret mRNA-eksport; regulering af transporten mellem kerne og cytoplasma; kromatinorganisering ved kernens periferi; underkompartimenter for kernetransport; genomets rumlige organisering; superopløsningsmikroskopi; SNAP-pulse-chase-mærkning; udelukkelse af heterokromatin fra poreassocierede områder

Karakteristika**Age**

15 år

Gender

Kvinde

Ethnicity

Kaukasisk

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-celler | 300667**Morphology** Epitel-lignende**Cell type** Epithelceller (osteosarkom)**Growth properties** Vedhæftende**Regulatoriske data****Citation** U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (Cytion katalognummer 300667)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** Ikke tildelt (CRISPR-modificeret U2OS-derivat; forælder-U2OS CVCL_0042)**Depositor** Ellenberg-laboratoriet (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Denne humane osteosarkomcellelinje (U2OS-CRISPR-TPR-SNAP) indeholder en CRISPR-konstrueret TPR-SNAP-fusion, der muliggør fluorescerende og kemisk mærkning af TPR-kernekurvproteinet. Konstruktionen er stabilt integreret. Denne klassificering gælder kun i Tyskland og kan variere andre steder.**Biomolekylære data****Protein expression** TPR, SNAP-tag**Håndtering****Culture Medium** McCoy's 5a, w: 3,0 g/L Glukose, w: stabil Glutamin, w: 2,0 mM Natriumpyruvat, w: 2,2 g/L NaHCO₃ (Cytion artikelnummer 820200a)**Supplements** Suppler mediet med 10 % FBS, 3,0 g/L glukose, stabil glutamin, 2,0 mM natriumpyruvat, 2,2 g/L NaHCO₃, 1 % NEAA**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** ca. 24 til 36 timer

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-celler | 300667

Subculturing Fjern det gamle medium fra de klæbende celler, og vask dem med PBS, der ikke indeholder calcium og magnesium. Brug 3-5 ml PBS til T25-kolber og 5-10 ml til T75-kolber. Dæk derefter cellerne helt med Accutase, brug 1-2 ml til T25-kolber og 2,5 ml til T75-kolber. Lad cellerne inkubere ved stuetemperatur i 8-10 minutter for at løsne dem. Efter inkubationen blandes cellerne forsigtigt med 10 ml medium for at resuspendere dem, og centrifugeres derefter ved 300xg i 3 minutter. Kassér supernatanten, resuspender cellerne i frisk medium, og overfør dem til nye kolber, der allerede indeholder frisk medium.

Split ratio 1 til 3

Seeding density 1 til 3×10^4 celler/cm²

Fluid renewal 2 til 3 gange om ugen

Freeze medium Som kryopræservationsmedium bruger vi komplet vækstmedium (inklusive FBS) + 10 % DMSO for tilstrækkelig levedygtighed efter optøning eller CM-1 (Cytion-katalognummer 800100), som indeholder optimerede osmobeskyttende stoffer og metaboliske stabilisatorer for at forbedre genopretningen og reducere kryo-induceret stress.

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

1. Bekræft, at hætteglasset forbliver dybfrosset ved levering, da cellerne sendes på tøris for at opretholde optimale temperaturer under transport.
2. Ved modtagelsen skal du enten straks opbevare kryohætteglasset ved temperaturer under -150 °C for at sikre, at cellernes integritet bevares, eller gå videre til trin 3, hvis øjeblikkelig dyrkning er påkrævet.
3. Ved øjeblikkelig dyrkning optøs hætteglasset hurtigt ved at nedsænke det i et 37 °C varmt vandbad med rent vand og et antimikrobielt middel og røre forsigtigt i 40-60 sekunder, indtil der kun er en lille isklump tilbage.
4. Udfør alle efterfølgende trin under sterile forhold i en flowhætte, og desinficer kryovialet med 70 % ethanol, før det åbnes.
5. Åbn forsigtigt det desinficerede hætteglas, og overfør cellesuspensionen til et 15 ml centrifugerør, der indeholder 8 ml kulturmedium ved stuetemperatur, og bland forsigtigt.
6. Centrifuger blandingen ved 300 x g i 3 minutter for at adskille cellerne, og kassér omhyggeligt supernatanten, der indeholder resterende frysemedium.
7. Resuspender forsigtigt cellepelleten i 10 ml frisk dyrkningsmedium. For klæbende celler deles suspensionen mellem to T25-kulturkolber; for suspensionskulturer overføres alt mediet til en T25-kolbe for at fremme effektiv celleinteraktion og -vækst.
8. Overhold etablerede subkulturprotokoller for fortsat vækst og vedligeholdelse af cellelinjen, hvilket sikrer pålidelige eksperimentelle resultater.

**Incubation
Atmosphere**

37°C, 5% CO_2 , befugt atmosfære.

Flask Coating

Ingen

**Freezing
Procedure**

Kryopræservede cellelinjer sendes på tøris i valideret, isoleret emballage med tilstrækkeligt kølemiddel til at opretholde ca. -78 °C under hele transporten. Ved modtagelse skal beholderen straks inspiceres, og hætteglassene skal straks overføres til passende opbevaring.

**Shipping
Conditions**

Kryopræservede cellelinjer sendes på tøris i valideret, isoleret emballage med tilstrækkeligt kølemiddel til at opretholde ca. -78 °C under hele transporten. Ved modtagelse skal beholderen straks inspiceres, og hætteglassene skal straks overføres til passende opbevaring.

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-celler | 300667

Storage Conditions

For langtidsopbevaring anbringes hætteglas i flydende nitrogen i dampfase ved ca. -150 til -196 °C. Opbevaring ved -80 °C er kun acceptabelt som et kort mellemtrin før overførsel til flydende nitrogen.

Kvalitetskontrol og molekylær analyse

Sterility

Mycoplasma-kontaminering udelukkes ved hjælp af både PCR-baserede assays og luminescensbaserede mycoplasma-detektionsmetoder.

For at sikre, at der ikke er nogen bakterie-, svampe- eller gærforurening, underkastes cellekulturerne daglige visuelle inspektioner.