Product sheet

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 nuklearporkomplekset (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

Karakteristika

Age	15 år
Gender	Kvinde
Ethnicity	Kaukasisk
Morphology	Epitel-lignende
Growth properties	Vedhæftende

Regulatoriske data

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-celler | 300667

Citation	U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (Cytion katalognummer 300667)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
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	McCoys 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
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.
Freeze medium	Som kryopræserveringsmedium 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%$_{CO2}$, befugtet atmosfære.
Flask Coating	Ingen
Freezing Procedure	Kryopræserverede 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	Kryopræserverede 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 / Genetisk profil / HLA

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.