

**U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-Zellen | 300667**

**Allgemeine Informationen**

**Description**

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP ist eine genomeditierte humane Osteosarkom-Zelllinie, die aus U2OS-Zellen gewonnen wurde, in denen das endogene TPR-Gen (Translocated Promoter Region) mithilfe der CRISPR/Cas9-Technologie modifiziert wurde, um ein In-Frame-SNAP-Tag zu kodieren. TPR ist ein großes Coiled-Coil-Nukleoporin, das sich im Kernkorb auf der nukleoplasmatischen Seite des Kernporenkomplexes (NPC) befindet. Durch die Markierung von TPR an seinem endogenen Locus wird das Fusionsprotein unter nativer regulatorischer Kontrolle exprimiert, wodurch die physiologischen Expressionsniveaus erhalten bleiben und die ordnungsgemäße Einbindung in die Kernkorbstruktur aufrechterhalten wird.

Das SNAP-Tag ermöglicht die kovalente Markierung von TPR mit Benzylguanin-konjugierten fluoreszierenden Substraten in lebenden oder fixierten Zellen, was eine hochspezifische und stabile Visualisierung ermöglicht. In U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-Zellen zeigt markiertes TPR eine charakteristische punktförmige ringförmige Verteilung an der Kernhülle, die den NPC-assoziierten Kernkorbstrukturen entspricht. Dieses System eignet sich gut für quantitative Fluoreszenzmikroskopie, Superauflösungsbildgebung, Pulse-Chase-Markierung und dynamische Untersuchungen der Kernkorb-Assemblierung und des Kernkorb-Umsatzes. Die flache Morphologie und die großen Kerne der U2OS-Zellen erleichtern die hochauflösende Bildgebung von Strukturen, die mit der Kernhülle assoziiert sind.

TPR spielt eine entscheidende Rolle beim mRNA-Export, der Regulation des Kerntransports, der Chromatinorganisation an der Kernperipherie und der räumlichen Genomorganisation. TPR ist auch an der Bildung von kernbezogenen Subkompartimenten und am Ausschluss von Heterochromatin aus den mit den Kernporen assoziierten Regionen beteiligt. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP bietet ein physiologisch relevantes Modell für die Analyse der Architektur und Dynamik des Kernkorbs, die Untersuchung von Mechanismen des nukleozytoplasmatischen Transports und die Untersuchung von Chromatin-Interaktionen im Zusammenhang mit der Kernhülle unter endogenen Expressionsbedingungen.

**Organism** Menschen

**Tissue** Knochen

**Disease** Osteosarkom

**Merkmale**

**Age** 15 Jahre

**Gender** Weiblich

**Ethnicity** Kaukasisch

**Morphology** Epithelähnlich

## U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-Zellen | 300667

**Growth properties** Adhärenz

## Regulatorische Daten

**Citation** U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (Cytion-Katalognummer 300667)

**Biosafety level** 1

**NCBI\_TaxID** 9606

**Depositor** Das Ellenberg-Labor (EMBL)

**GMO Status** GMO-S1: Diese humane Osteosarkom-Zelllinie (U2OS-CRISPR-TPR-SNAP) enthält eine CRISPR-gezüchtete TPR-SNAP-Fusion, die eine fluoreszierende und chemische Markierung des TPR-Kernproteins ermöglicht. Das Konstrukt ist stabil integriert. Diese Klassifizierung gilt nur innerhalb Deutschlands und kann in anderen Ländern abweichen.

## Biomolekulare Daten

**Protein expression** TPR, SNAP-Tag

## Handhabung

**Culture Medium** McCoys 5a, w: 3,0 g/L Glucose, w: stabiles Glutamin, w: 2,0 mM Natriumpyruvat, w: 2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub> (Cytion-Artikelnummer 820200a)

**Supplements** Ergänzen Sie das Medium mit 10% FBS, 3,0 g/L Glucose, stabilem Glutamin, 2,0 mM Natriumpyruvat, 2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 1% NEAA

**Dissociation Reagent** Accutase

**Subculturing** Entfernen Sie das alte Medium von den adhärenz Zellen und waschen Sie sie mit PBS, das kein Kalzium und Magnesium enthält. Für T25-Kolben 3-5 ml PBS und für T75-Kolben 5-10 ml verwenden. Anschließend werden die Zellen vollständig mit Accutase bedeckt, wobei 1-2 ml für T25-Kolben und 2,5 ml für T75-Kolben verwendet werden. Lassen Sie die Zellen 8-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren, um sie abzulösen. Nach der Inkubation mischen Sie die Zellen vorsichtig mit 10 ml Medium, um sie zu resuspendieren, und zentrifugieren sie dann 3 Minuten lang bei 300xg. Den Überstand verwerfen, die Zellen in frischem Medium resuspendieren und in neue Kolben überführen, die bereits frisches Medium enthalten.

## U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-Zellen | 300667

### Freeze medium

Als Kryokonservierungsmedium verwenden wir komplettes Wachstumsmedium (einschließlich FBS) + 10 % DMSO für eine angemessene Lebensfähigkeit nach dem Auftauen oder CM-1 (Cytion Katalognummer 800100), das optimierte Osmoprotektoren und Stoffwechselstabilisatoren enthält, um die Erholung zu verbessern und kryoinduzierten Stress zu reduzieren.

### Thawing and Culturing Cells

1. Vergewissern Sie sich, dass das Fläschchen bei der Lieferung tiefgefroren ist, da die Zellen auf Trockeneis versandt werden, um während des Transports optimale Temperaturen zu erhalten.
2. Lagern Sie das Kryofläschchen nach Erhalt entweder sofort bei Temperaturen unter -150 °C, um die Unversehrtheit der Zellen zu gewährleisten, oder fahren Sie mit Schritt 3 fort, wenn eine sofortige Kultivierung erforderlich ist.
3. Für eine sofortige Kultivierung tauen Sie das Fläschchen schnell auf, indem Sie es in ein 37°C warmes Wasserbad mit sauberem Wasser und einem antimikrobiellen Mittel eintauchen und 40-60 Sekunden lang vorsichtig schütteln, bis ein kleiner Eisklumpen zurückbleibt.
4. Führen Sie alle weiteren Schritte unter sterilen Bedingungen in einer Abzugshaube durch und desinfizieren Sie das Kryo-Fläschchen vor dem Öffnen mit 70%igem Ethanol.
5. Das desinfizierte Fläschchen vorsichtig öffnen und die Zellsuspension unter vorsichtigem Mischen in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit 8 ml Kulturmedium bei Raumtemperatur überführen.
6. Zentrifugieren Sie das Gemisch 3 Minuten lang bei 300 x g, um die Zellen abzutrennen, und werfen Sie den Überstand mit dem restlichen Gefriermedium vorsichtig.
7. Das Zellpellet vorsichtig in 10 ml frischem Kulturmedium resuspendieren. Bei adhärennten Zellen die Suspension auf zwei T25-Kulturflaschen aufteilen; bei Suspensionskulturen das gesamte Medium in eine T25-Flasche überführen, um eine effektive Zellinteraktion und ein effektives Wachstum zu fördern.
8. Halten Sie sich an die festgelegten Subkulturprotokolle, um ein kontinuierliches Wachstum und die Aufrechterhaltung der Zelllinie zu gewährleisten und zuverlässige Versuchsergebnisse zu erzielen.

### Incubation Atmosphere

37°C, 5%<sub>CO2</sub>, befeuchtete Atmosphäre.

### Flask Coating

Keine

### Freezing Procedure

Kryokonservierte Zelllinien werden auf Trockeneis in einer validierten, isolierten Verpackung mit ausreichend Kühlmittel versandt, um während des gesamten Transports eine Temperatur von etwa -78 °C aufrechtzuerhalten. Prüfen Sie den Behälter bei Erhalt sofort und bringen Sie die Fläschchen unverzüglich in ein geeignetes Lager.

## U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-Zellen | 300667

### Shipping Conditions

Kryokonservierte Zelllinien werden auf Trockeneis in einer validierten, isolierten Verpackung mit ausreichend Kühlmittel versandt, um während des gesamten Transports eine Temperatur von etwa -78 °C aufrechtzuerhalten. Prüfen Sie den Behälter bei Erhalt sofort und bringen Sie die Fläschchen unverzüglich in ein geeignetes Lager.

### Storage Conditions

Zur Langzeitkonservierung werden die Fläschchen in flüssigem Stickstoff bei etwa -150 bis -196 °C gelagert. Eine Lagerung bei -80 °C ist nur als kurzer Zwischenschritt vor der Überführung in flüssigen Stickstoff akzeptabel.

## Qualitätskontrolle / Genetisches Profil / HLA

### Sterility

Eine Kontamination mit Mykoplasmen wird sowohl durch PCR-basierte Assays als auch durch lumineszenzbasierte Mykoplasmen-Nachweisverfahren ausgeschlossen.

Um sicherzustellen, dass keine Kontamination mit Bakterien, Pilzen oder Hefen vorliegt, werden die Zellkulturen täglich visuell überprüft.