Product sheet

Κύτταρα U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Γενικές πληροφορίες

Description	Το U2OS-CRISPR-TPR-SNAP είναι μια γενετικά τροποποιημένη ανθρώπινη κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος που προέρχεται από κύτταρα U2OS, στα οποία το ενδογενές γονίδιο TPR (Translocated Promoter Region) έχει τροποποιηθεί χρησιμοποιώντας την τεχνολογία CRISPR/Cas9 για την κωδικοποίηση μιας ετικέτας SNAP εντός πλαισίου. Το TPR είναι μια μεγάλη νουκλεοπρωτεΐνη με σπειροειδή δομή που εντοπίζεται στο πυρηνικό καλάθι στην πυρηνική πλευρά του πυρηνικού πόρου (NPC). Με την επισήμανση του TPR στον ενδογενή του τόπο, η πρωτεΐνη σύντηξης εκφράζεται υπό φυσιολογικό ρυθμιστικό έλεγχο, διατηρώντας τα φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης και τη σωστή ενσωμάτωση στη δομή του πυρηνικού καλαθιού. Η ετικέτα SNAP επιτρέπει την ομοιοπολική επισήμανση του TPR με υποστρώματα φθορισμού συζευγμένα με βενζυλογουανίνη σε ζωντανά ή σταθερά κύτταρα, επιτρέποντας εξαιρετικά συγκεκριμένη και σταθερή οπτικοποίηση. Στα κύτταρα U2OS-CRISPR-TPR-SNAP, η επισημασμένη TPR εμφανίζει μια χαρακτηριστική διάταξη σε μορφή δακτυλίου στο πυρηνικό περίβλημα, που αντιστοιχεί στις δομές του πυρηνικού καλαθιού που σχετίζονται με το NPC. Αυτό το σύστημα είναι κατάλληλο για ποσοτική φθορισμοσκοπία, απεικόνιση υπερ-ανάλυσης, επισήμανση παλμού-κυνηγητού και δυναμικές μελέτες της συναρμολόγησης και της ανανέωσης του πυρηνικού καλαθιού. Η επίπεδη μορφολογία και οι μεγάλοι πυρήνες των κυττάρων U2OS διευκολύνουν την απεικόνιση υψηλής ανάλυσης των δομών που σχετίζονται με το πυρηνικό περίβλημα. Το TPR διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην εξαγωγή mRNA, στη ρύθμιση της πυρηνικής μεταφοράς, στην οργάνωση της χρωματίνης στην περιφέρεια του πυρήνα και στην χωρική οργάνωση του γονιδιώματος. Το TPR εμπλέκεται επίσης στη διαμόρφωση υποδιαμερισμάτων που σχετίζονται με την πυρηνική μεταφορά και στον αποκλεισμό της ετεροχρωματίνης από περιοχές που σχετίζονται με τους πυρηνικούς πόρους. Το U2OS-CRISPR-TPR-SNAP παρέχει ένα φυσιολογικά σχετικό μοντέλο για την ανάλυση της αρχιτεκτονικής και της δυναμικής του πυρηνικού καλαθιού, τη διερεύνηση των μηχανισμών μεταφοράς μεταξύ πυρήνα και κυτταρόπλασμα και τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων της χρωματίνης που σχετίζονται με το πυρηνικό περίβλημα υπό ενδογενείς συνθήκες έκφρασης.
Organism	Ανθρώπινο
Tissue	Οστά
Disease	Οστεοσάρκωμα
Metastatic site	Θέση πρωτογενούς όγκου (οστό)
Applications	Βιολογία του πυρηνικού καλαθιού· εξαγωγή mRNA με τη μεσολάβηση της TPR· ρύθμιση της πυρηνοκυτταροπλασματικής μεταφοράς· οργάνωση της χρωματίνης στην περιφέρεια του πυρήνα· υποδιαμερίσματα πυρηνικής μεταφοράς· χωρική οργάνωση του γονιδιώματος· μικροσκοπία υπερ-ανάλυσης· σήμανση SNAP με τη μέθοδο pulse-chase· αποκλεισμός της ετεροχρωματίνης από περιοχές που σχετίζονται με πόρους

Χαρακτηριστικά

Age	15 χρόνια

Κύτταρα U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Gender	Γυναίκα
Ethnicity	Καυκάσιος
Morphology	Επιθηλιοειδής
Cell type	Επιθηλιακά κύτταρα (οστεοσάρκωμα)
Growth properties	Προσκολλημένο

Ρυθμιστικά δεδομένα

Citation	U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (αριθμός καταλόγου Cytion 300667)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Δεν έχει αποδοθεί (παράγωγο U2OS τροποποιημένο με CRISPR· γονικό U2OS CVCL_0042)
Depositor	Εργαστήριο Ellenberg (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Αυτή η ανθρώπινη κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος (U2OS-CRISPR-TPR-SNAP) περιέχει μια CRISPR-σχεδιασμένη σύντηξη TPR-SNAP που επιτρέπει τη φθορίζουσα και χημική σήμανση της πρωτεΐνης πυρηνικού καλαθιού TPR. Το κατασκεύασμα ενσωματώνεται σταθερά. Η ταξινόμηση αυτή ισχύει μόνο εντός της Γερμανίας και ενδέχεται να διαφέρει αλλού.

Βιομοριακά δεδομένα

Protein expression	TPR, SNAP-tag

Χειρισμός

Culture Medium	McCoys 5a, w: 3,0 g/L γλυκόζη, w: σταθερή γλουταμίνη, w: 2,0 mM πυρουβικό νάτριο, w: 2,2 g/L NaHCO3 (αριθμός άρθρου Cytion 820200a)
Supplements	Συμπληρώστε το μέσο με 10% FBS, 3,0 g/L γλυκόζη, σταθερή γλουταμίνη, 2,0 mM πυρουβικό νάτριο, 2,2 g/L NaHCO3, 1% NEAA

Κύτταρα U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Dissociation Reagent	Accutase
Doubling time	περίπου 24 έως 36 ώρες
Subculturing	Αφαιρέστε το παλιό μέσο από τα προσκολλημένα κύτταρα και πλύντε τα με PBS που δεν περιέχει ασβέστιο και μαγνήσιο. Για φιάλες T25, χρησιμοποιήστε 3-5 ml PBS και για φιάλες T75, χρησιμοποιήστε 5-10 ml. Στη συνέχεια, καλύψτε πλήρως τα κύτταρα με Accutase, χρησιμοποιώντας 1-2 ml για φιάλες T25 και 2,5 ml για φιάλες T75. Αφήστε τα κύτταρα να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου για 8-10 λεπτά για να αποκολληθούν. Μετά την επώαση, αναμείξτε απαλά τα κύτταρα με 10 ml μέσου για να ανασυσταθούν και, στη συνέχεια, φυγοκεντρίστε στα 300xg για 3 λεπτά. Απορρίψτε το υπερκείμενο υγρό, ανασυστάστε τα κύτταρα σε φρέσκο μέσο και μεταφέρετέ τα σε νέες φιάλες που περιέχουν ήδη φρέσκο μέσο.
Split ratio	1 έως 3
Seeding density	1 έως 3 × 10^4 κύτταρα/cm^2
Fluid renewal	2 έως 3 φορές την εβδομάδα
Freeze medium	Ως μέσο κρυοσυντήρησης, χρησιμοποιούμε πλήρες μέσο ανάπτυξης (συμπεριλαμβανομένου του FBS) + 10% DMSO για επαρκή βιωσιμότητα μετά την απόψυξη, ή CM-1 (αριθμός καταλόγου Cytion 800100), το οποίο περιλαμβάνει βελτιστοποιημένα ωσμοπροστατευτικά και μεταβολικούς σταθεροποιητές για την ενίσχυση της ανάκαμψης και τη μείωση του στρες που προκαλείται από την κρυοσυντήρηση.

Κύτταρα U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Thawing and Culturing Cells

1. Επιβεβαιώστε ότι το φιαλίδιο παραμένει βαθιά παγωμένο κατά την παράδοση, καθώς τα κύτταρα αποστέλλονται σε ξηρό πάγο για να διατηρούνται οι βέλτιστες θερμοκρασίες κατά τη μεταφορά.

2. Κατά την παραλαβή, είτε αποθηκεύστε το κρυοφιαλίδιο αμέσως σε θερμοκρασίες κάτω των -150°C για να διασφαλίσετε τη διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας, είτε προχωρήστε στο βήμα 3 εάν απαιτείται άμεση καλλιέργεια.

3. Για άμεση καλλιέργεια, αποψύξτε γρήγορα το φιαλίδιο βυθίζοντάς το σε υδατόλουτρο 37°C με καθαρό νερό και αντιμικροβιακό παράγοντα, αναδεύοντας απαλά για 40-60 δευτερόλεπτα μέχρι να παραμείνει ένα μικρό σβόλο πάγου.

4. Εκτελέστε όλα τα επόμενα βήματα υπό αποστειρωμένες συνθήκες σε απορροφητήρα ροής, απολυμαίνοντας το κρυοφιαλίδιο με 70% αιθανόλη πριν από το άνοιγμα.

5. Ανοίξτε προσεκτικά το απολυμασμένο φιαλίδιο και μεταφέρετε το εναιώρημα των κυττάρων σε ένα σωληνάριο φυγοκέντρησης των 15 ml που περιέχει 8 ml θρεπτικού μέσου καλλιέργειας σε θερμοκρασία δωματίου, αναμειγνύοντας απαλά.

6. Φυγοκεντρίστε το μείγμα στα 300 x g για 3 λεπτά για να διαχωριστούν τα κύτταρα και απορρίψτε προσεκτικά το υπερκείμενο που περιέχει το υπόλοιπο μέσο κατάψυξης.

7. Επανασυσσωματώστε απαλά το κυτταρικό σφαιρίδιο σε 10 ml φρέσκου μέσου καλλιέργειας. Για προσκολλημένα κύτταρα, μοιράστε το εναιώρημα σε δύο φιάλες καλλιέργειας T25- για καλλιέργειες εναιωρήματος, μεταφέρετε όλο το μέσο σε μία φιάλη T25 για να προωθήσετε την αποτελεσματική αλληλεπίδραση και ανάπτυξη των κυττάρων.

8. Τηρείτε τα καθιερωμένα πρωτόκολλα υποκαλλιέργειας για τη συνεχή ανάπτυξη και διατήρηση της κυτταρικής σειράς, εξασφαλίζοντας αξιόπιστα πειραματικά αποτελέσματα.

Incubation Atmosphere	37°C, 5%$_{CO2}$, υγροποιημένη ατμόσφαιρα.
Flask Coating	Κανένα
Freezing Procedure	Οι κρυοσυντηρημένες κυτταρικές σειρές αποστέλλονται σε ξηρό πάγο σε επικυρωμένη, μονωμένη συσκευασία με επαρκές ψυκτικό μέσο για τη διατήρηση περίπου των -78 °C καθ' όλη τη διάρκεια της μεταφοράς. Κατά την παραλαβή, επιθεωρήστε αμέσως τον περιέκτη και μεταφέρετε τα φιαλίδια χωρίς καθυστέρηση στην κατάλληλη αποθήκη.

Κύτταρα U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Shipping Conditions	Οι κρυοσυντηρημένες κυτταρικές σειρές αποστέλλονται σε ξηρό πάγο σε επικυρωμένη, μονωμένη συσκευασία με επαρκές ψυκτικό μέσο για τη διατήρηση περίπου των -78 °C καθ' όλη τη διάρκεια της μεταφοράς. Κατά την παραλαβή, επιθεωρήστε αμέσως τον περιέκτη και μεταφέρετε τα φιαλίδια χωρίς καθυστέρηση στην κατάλληλη αποθήκη.
Storage Conditions	Για μακροχρόνια συντήρηση, τοποθετήστε τα φιαλίδια σε υγρό άζωτο σε φάση ατμών σε θερμοκρασία περίπου -150 έως -196 °C. Η αποθήκευση στους -80 °C είναι αποδεκτή μόνο ως σύντομο ενδιάμεσο βήμα πριν από τη μεταφορά σε υγρό άζωτο.

Έλεγχος ποιότητας και μοριακή ανάλυση

Sterility	Η μόλυνση από μυκόπλασμα αποκλείεται με τη χρήση τόσο των δοκιμασιών που βασίζονται στην PCR όσο και των μεθόδων ανίχνευσης μυκοπλάσματος με βάση τη φωταύγεια. Για να διασφαλιστεί ότι δεν υπάρχει μόλυνση από βακτήρια, μύκητες ή ζύμες, οι κυτταροκαλλιέργειες υποβάλλονται σε καθημερινές οπτικές επιθεωρήσεις.