

Células U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667**Información general****Description**

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP es una línea celular de osteosarcoma humano editada genómicamente derivada de células U2OS en la que se ha modificado el gen TPR (región promotora translocada) endógeno mediante la tecnología CRISPR/Cas9 para codificar una etiqueta SNAP en marco. El TPR es una nucleoporina grande en forma de espiral que se localiza en la cesta nuclear en el lado nucleoplásmico del complejo de poros nucleares (NPC). Al etiquetar el TPR en su locus endógeno, la proteína de fusión se expresa bajo control regulador nativo, conservando los niveles de expresión fisiológicos y manteniendo la incorporación adecuada en la estructura de la cesta nuclear.

La etiqueta SNAP permite el marcaje covalente de TPR con sustratos fluorescentes conjugados con bencilguanina en células vivas o fijadas, lo que permite una visualización altamente específica y estable. En las células U2OS-CRISPR-TPR-SNAP, el TPR marcado muestra una distribución característica en forma de anillo punteado en la envoltura nuclear, que se corresponde con las estructuras de la cesta nuclear asociadas al NPC. Este sistema es muy adecuado para la microscopía de fluorescencia cuantitativa, la obtención de imágenes de superresolución, el marcaje por pulso-persecución y los estudios dinámicos del ensamblaje y el recambio de la cesta nuclear. La morfología plana y los núcleos grandes de las células U2OS facilitan la obtención de imágenes de alta resolución de las estructuras asociadas a la envoltura nuclear.

El TPR desempeña un papel fundamental en la exportación del ARNm, la regulación del transporte nuclear, la organización de la cromatina en la periferia nuclear y la organización espacial del genoma. El TPR también interviene en la formación de subcompartimentos relacionados con el transporte nuclear y en la exclusión de la heterocromatina de las regiones asociadas a los poros nucleares. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP proporciona un modelo fisiológicamente relevante para diseccionar la arquitectura y la dinámica de la cesta nuclear, investigar los mecanismos de tráfico nucleocitoplasmático y estudiar las interacciones de la cromatina asociadas a la envoltura nuclear en condiciones de expresión endógena.

Organism Humano**Tissue** Hueso**Disease** Osteosarcoma**Características****Age** 15 años**Gender** Mujer**Ethnicity** Caucásico**Morphology** De tipo epitelial

Células U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Growth properties Adherente

Datos reglamentarios

Citation U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (número de catálogo de Cytion 300667)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

Depositor Laboratorio Ellenberg (EMBL)

GMO Status GMO-S1: Esta línea celular de osteosarcoma humano (U2OS-CRISPR-TPR-SNAP) contiene una fusión TPR-SNAP manipulada mediante CRISPR que permite el marcaje fluorescente y químico de la proteína cesta nuclear TPR. La construcción está integrada de forma estable. Esta clasificación sólo se aplica en Alemania y puede diferir en otros países.

Datos biomoleculares

Protein expression TPR, etiqueta SNAP

Manejo de

Culture Medium McCoys 5a, w: 3,0 g/L Glucosa, w: Glutamina estable, w: 2,0 mM Piruvato sódico, w: 2,2 g/L NaHCO₃ (número de artículo de Cytion 820200a)

Supplements Suplementar el medio con 10% FBS, 3,0 g/L de Glucosa, Glutamina estable, 2,0 mM de Piruvato sódico, 2,2 g/L de NaHCO₃, 1% de NEAA

Dissociation Reagent Accutase

Subculturing Retire el medio antiguo de las células adheridas y lávelas con PBS que carezca de calcio y magnesio. Para matraces T25, utilice 3-5 ml de PBS, y para matraces T75, utilice 5-10 ml. A continuación, cubra completamente las células con Accutase, utilizando 1-2 ml para matraces T25 y 2,5 ml para matraces T75. Deje incubar las células a temperatura ambiente durante 8-10 minutos para desprenderlas. Tras la incubación, mezclar suavemente las células con 10 ml de medio para resuspenderlas y, a continuación, centrifugar a 300xg durante 3 minutos. Desechar el sobrenadante, resuspender las células en medio fresco y transferirlas a nuevos matraces que ya contengan medio fresco.

Células U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Freeze medium

Como medio de criopreservación, utilizamos el medio de crecimiento completo (incluido FBS) + 10% DMSO para una viabilidad adecuada tras la descongelación, o CM-1 (número de catálogo 800100 de Cytion), que incluye osmoprotectores optimizados y estabilizadores metabólicos para mejorar la recuperación y reducir el estrés crioinducido.

Thawing and Culturing Cells

1. Confirme que el vial permanece profundamente congelado en el momento de la entrega, ya que las células se envían en hielo seco para mantener temperaturas óptimas durante el transporte.
2. Tras la recepción, almacene el criovial inmediatamente a temperaturas inferiores a -150°C para garantizar la conservación de la integridad celular, o proceda al paso 3 si se requiere el cultivo inmediato.
3. Para el cultivo inmediato, descongele rápidamente el vial sumergiéndolo en un baño de agua a 37°C con agua limpia y un agente antimicrobiano, agitando suavemente durante 40-60 segundos hasta que quede un pequeño grumo de hielo.
4. Realice todos los pasos siguientes en condiciones estériles en una campana de flujo, desinfectando el criovial con etanol al 70% antes de abrirlo.
5. Abrir con cuidado el vial desinfectado y transferir la suspensión celular a un tubo de centrifuga de 15 ml que contenga 8 ml de medio de cultivo a temperatura ambiente, mezclando suavemente.
6. Centrifugar la mezcla a 300 x g durante 3 minutos para separar las células y desechar cuidadosamente el sobrenadante que contiene medio de congelación residual.
7. Resuspender suavemente el sedimento celular en 10 ml de medio de cultivo fresco. Para las células adherentes, dividir la suspensión entre dos matraces de cultivo T25; para los cultivos en suspensión, transferir todo el medio a un matraz T25 para promover la interacción y el crecimiento celular efectivos.
8. Siga los protocolos de subcultivo establecidos para el crecimiento y mantenimiento continuos de la línea celular, garantizando resultados experimentales fiables.

Incubation Atmosphere

37°C, 5%_{CO2}, atmósfera humidificada.

Flask Coating

Ninguno

Freezing Procedure

Las líneas celulares criopreservadas se envían en hielo seco en envases validados y aislados con suficiente refrigerante para mantener aproximadamente -78 °C durante el tránsito. A la recepción, inspeccione el envase inmediatamente y transfiera los viales sin demora al almacenamiento adecuado.

Células U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Shipping Conditions

Las líneas celulares crioconservadas se envían en hielo seco en envases validados y aislados con suficiente refrigerante para mantener aproximadamente -78 °C durante el tránsito. A la recepción, inspeccione el envase inmediatamente y transfiera los viales sin demora al almacenamiento adecuado.

Storage Conditions

Para la conservación a largo plazo, coloque los viales en nitrógeno líquido en fase vapor a una temperatura aproximada de -150 a -196 °C. El almacenamiento a -80 °C sólo es aceptable como breve paso intermedio antes de la transferencia al nitrógeno líquido.

Control de calidad / Perfil genético / HLA

Sterility

La contaminación por micoplasma se excluye utilizando tanto ensayos basados en la PCR como métodos de detección de micoplasma basados en la luminiscencia.

Para garantizar la ausencia de contaminación bacteriana, fúngica o por levaduras, los cultivos celulares se someten a inspecciones visuales diarias.