

**U2OS-CRISPR-TPR-TPR-SNAP rakud | 300667****Üldine teave****Description**

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP on genoomi muundatud inimese osteosarkoomi rakuliin, mis on saadud U2OS rakkudest, milles endogeenne TPR (Translocated Promoter Region) geen on muundatud CRISPR/Cas9 tehnoloogia abil, et kodeerida in-frame SNAP-märgistust. TPR on suur spiraalselt keerutatud nukleoporiin, mis lokaliseerub tuumapoorikompleksi (NPC) tuumapoolsel küljel asuvasse tuumakorvi. TPR-i märgistamisega selle endogeenses lokuses ekspresseeritakse fusioonvalku loomuliku regulatsiooni kontrolli all, säilitades füsioloogilised ekspresioonitasemed ja tagades nõuetekohase inkorporeerumise tuumakorvi struktuuri.

SNAP-märgis võimaldab TPR-i kovalentset märgistamist bentsüülguaniiniga konjugeeritud fluorestsentssubstraatidega elusates või fikseeritud rakkudes, võimaldades väga spetsiifilist ja stabiilset visualiseerimist. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP rakkudes näitab märgistatud TPR tuumaümbrise juures iseloomulikku punktilist rõngakujulist jaotust, mis vastab NPC-ga seotud tuumakorvi struktuuridele. See süsteem sobib hästi kvantitatiivseks fluorestsentsmikroskoopiase, ülikõrge resolutsiooniga pildistamiseks, impulss-jälgimise märgistamiseks ja tuumakorvi kokkupaneku ja ringluse dünaamiliseks uurimiseks. U2OS rakkude lame morfoloogia ja suured tuumad hõlbustavad tuumaümbrise struktuuride kõrge resolutsiooniga pildistamist.

TPR mängib olulist rolli mRNA ekspordis, tuuma transpordi reguleerimises, kromatiini organiseerimises tuuma äärealal ja genoomi ruumilises organiseerimises. TPR on seotud ka tuuma transpordiga seotud alajaotuste moodustumise ja heterokromatiini välistamisega tuuma pooridega seotud piirkondadest. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP pakub füsioloogiliselt asjakohast mudelit tuumakorvi arhitektuuri ja dünaamika analüüsimiseks, tuumatsütoplasma transpordimehhanismide uurimiseks ja tuumakestaga seotud kromatiini interaktsioonide uurimiseks endogeensete ekspresioonitingimuste all.

<b>Organism</b>	Inimene
<b>Tissue</b>	Bone
<b>Disease</b>	Osteosarkoom

**Omadused**

<b>Age</b>	15 aastat
<b>Gender</b>	Naised
<b>Ethnicity</b>	Kaukaasia
<b>Morphology</b>	Epiteelilaadsed
<b>Growth properties</b>	Kinnipeetav

**Regulatiivsed andmed**

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

<b>Citation</b>	U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (Cytioni katalooginumber 300667)
<b>Biosafety level</b>	1
<b>NCBI_TaxID</b>	9606
<b>Depositor</b>	Ellenbergi labor (EMBL)
<b>GMO Status</b>	GMO-S1: See inimese osteosarkoomi rakuliini (U2OS-CRISPR-TPR-SNAP) sisaldab CRISPR-töödeldud TPR-SNAP-fusiooni, mis võimaldab TPR-tuumakorvivalgu fluorestseeruvat ja keemilist märgistamist. Konstruksioon on stabiilselt integreeritud. See klassifikatsioon kehtib ainult Saksamaal ja võib mujal erineda.

**Biomolekulaarsed andmed**

<b>Protein expression</b>	TPR, SNAP-tag
---------------------------	---------------

**Töötlemine**

<b>Culture Medium</b>	McCoys 5a, w: 3,0 g/L glükoos, w: stabiilne glutamiin, w: 2,0 mM naatriumpüruvaat, w: 2,2 g/L NaHCO <sub>3</sub> (Cytioni artikli number 820200a)
<b>Supplements</b>	Täiendada söötme 10% FBS, 3,0 g/L glükoosi, stabiilse glutamiini, 2,0 mM naatriumpüruvaadi, 2,2 g/L NaHCO <sub>3</sub> , 1% NEAAga
<b>Dissociation Reagent</b>	Accutase
<b>Subculturing</b>	Eemaldage kleepunud rakkudel vana söötme ja peske neid PBS-ga, milles puudub kaltsium ja magneesium. T25 kolbide puhul kasutage 3-5 ml PBS-i ja T75 kolbide puhul 5-10 ml. Seejärel katke rakud täielikult Accutase'iga, kasutades 1-2 ml T25 kolbide puhul ja 2,5 ml T75 kolbide puhul. Laske rakkudel inkubeerida 8-10 minutit toatemperatuuril, et need eralduksid. Pärast inkubeerimist segage rakud ettevaatlikult 10 ml söötmega, et neid resuspenseerida, seejärel tsentrifuugige 3 minutit 300xg juures. Visake supernatant ära, suspenseerige rakud uuesti värskes keskkonnas ja viige need uutesse kolvidesse, mis sisaldavad juba värsket keskkonda.
<b>Freeze medium</b>	Krüs säilitusvedelikusena kasutame täielikku kasvukeskkonda (sh FBS) + 10% DMSO, et tagada piisav elujõulisus pärast sulatamist, või CM-1 (Cytioni katalooginumber 800100), mis sisaldab optimeeritud osmoprotektante ja metaboolseid stabilisaatoreid, et parandada taastumist ja vähendada krüostressi.

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

1. Veenduge, et vial jääb tarnimisel sügavkülmutatud, sest rakud transporditakse kuiva jääga, et säilitada optimaalne temperatuur transpordi ajal.
2. Pärast kättesaamist säilitage krüoviaal kas kohe temperatuuril alla -150 °C, et tagada rakkude terviklikkuse säilimine, või jätkake sammuga 3, kui on vaja koheselt kultiveerida.
3. Kohese kultiveerimise korral sulatage viali kiiresti, kastes selle 37 °C veevanni puhta vee ja antimikroobse ainega, segades seda õrnalt 40-60 sekundit, kuni alles jääb väike jääklomp.
4. Tehke kõik järgmised toimingud steriilsetes tingimustes vooluhoodis, desinfitseerides krüoviaal enne avamist 70% etanooliga.
5. Avage desinfitseeritud viali ettevaatlikult ja viige raku suspensioon ettevaatlikult segades 15 ml tsentrifuugitorusse, mis sisaldab 8 ml toatemperatuuril olevat kasvukeskkonda.
6. Rakkude eraldamiseks tsentrifuugige segu 300 x g juures 3 minutit ja visake ülejäänud külmutusvedelikku sisaldav supernatant ettevaatlikult ära.
7. Resuspendeerige rakupellet ettevaatlikult 10 ml värskes kasvukeskkonnas. Adhereerivate rakkude puhul jagage suspensioon kahe T25 kultuurkolvi vahel; suspensioonikultuuride puhul kandke kogu söötme keskkond ühte T25 kolbi, et soodustada rakkude tõhusat koostoimet ja kasvu.
8. Järgige kehtestatud subkultuuriprotokolle rakuliini jätkuvaks kasvuks ja säilitamiseks, tagades usaldusväärsed katsetulemused.

**Incubation  
Atmosphere**

37°C, 5% CO<sub>2</sub>, niisutatud atmosfäär.

**Flask Coating**

Puudub

**Freezing  
Procedure**

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu -78 °C. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige vialid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

**Shipping  
Conditions**

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu -78 °C. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige vialid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

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

### Storage Conditions

Pikaajaliseks säilitamiseks asetage viaalid aurufaasis vedela lämmastikuga umbes -150 kuni -196 °C juures. Säilitamine temperatuuril -80 °C on vastuvõetav ainult lühikese vaheetapina enne vedela lämmastikuga üleviimist.

## Kvaliteedikontroll / Geneetiline profiil / HLA

### Sterility

Mükoplasmakontaminatsioon on välistatud nii PCR-põhiste analüüside kui ka luminesentsil põhinevate mükoplasma tuvastamise meetodite abil.

Bakteriaalse, seene- või pärmsaaste puudumise tagamiseks kontrollitakse rakukultuure iga päev visuaalselt.