

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

## Yleisiä tietoja

## Description

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP on genomini muokattu ihmisen osteosarkoomasolulinja, joka on peräisin U2OS-soluista, joissa endogeeninen TPR-geeni (Translocated Promoter Region) on muokattu CRISPR/Cas9-tekniikalla koodaamaan in-frame SNAP-tagia. TPR on suuri kierteinen nukleoporiini, joka lokalisoituu ydinporikompleksin (NPC) nukleoplasmisen puolen ydinkoriin. Merkitsemällä TPR:n sen endogeeniseen lokukseen fuusioproteiini ilmaistaan natiivin säätelyn alaisena, säilyttäen fysiologiset ilmentymistasot ja ylläpitäen asianmukaista sisällyttämistä ydinkorirakenteeseen.

SNAP-tag mahdollistaa TPR:n kovalenttisen leimauksen bentsyyliguaninikonjugoitujen fluoresoivien substraattien avulla elävissä tai kiinnitetyissä soluissa, mikä mahdollistaa erittäin spesifisen ja vakaan visualisoinnin. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-soluissa leimattu TPR näyttää tyypillisen pisteellisen rengasmaisen jakautumisen ydinvaipassa, mikä vastaa NPC:hen liittyviä ydinkorin rakenteita. Tämä järjestelmä sopii hyvin kvantitatiiviseen fluoresenssimikroskopiaan, superresoluutioiseen kuvantamiseen, pulssin jäljitysleimaukseen ja ydinkorin kokoonpanon ja kierron dynaamisiin tutkimuksiin. U2OS-solujen tasainen morfologia ja suuret ytimet helpottavat ydinvaipaan liittyvien rakenteiden korkean resoluution kuvantamista.

TPR:llä on tärkeä rooli mRNA:n viennissä, ydinkuljetuksen säätelyssä, kromatiinin organisoinnissa ytimen reuna-alueella ja genomini spatiaalisessa organisoinnissa. TPR on myös mukana ydinkuljetukseen liittyvien alikompartimenttien muodostumisessa ja heterokromatiinin poissulkemisessa ydinporoihin liittyvistä alueista. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP tarjoaa fysiologisesti merkityksellisen mallin ydinkorin rakenteen ja dynamiikan analysoimiseksi, nukleosyttoplasmisen kuljetuksen mekanismien tutkimiseksi ja ydinkoteloon liittyvien kromatiinin vuorovaikutusten tutkimiseksi endogeenisissä ilmentymisolosuhteissa.

**Organism** Ihminen

**Tissue** Luu

**Disease** Osteosarkooma

**Metastatic site** Ensisijainen kasvaimen sijainti (luu)

**Applications** Ydin-kori-biologia; TPR-välitteinen mRNA:n vienti; ydin-syttoplasmakuljetuksen säätely; kromatiinin järjestäytyminen ytimen reuna-alueilla; ydinkuljetuksen osakompartimentit; genomini tilallinen järjestäytyminen; superresoluutiomikroskopia; SNAP-pulssi-jahtausmerkintä; heterokromatiinin poissulkeminen huokosliitännäisiltä alueilta

## Ominaisuudet

**Age** 15 vuotta

**Gender** Nainen

**Ethnicity** Kaukasialainen

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

**Morphology** Epiteelin kaltainen

**Cell type** Epiteelisolut (osteosarkooma)

**Growth properties** Tarttuva

## Säätelytiedot

**Citation** U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (Cytionin luettelonumero 300667)

**Biosafety level** 1

**NCBI\_TaxID** 9606

**CellosaurusAccession** Ei määritelty (CRISPR-muunnettu U2OS-johdannainen; emokanta U2OS CVCL\_0042)

**Depositor** Ellenbergin laboratorio (EMBL)

**GMO Status** GMO-S1: Tämä ihmisen osteosarkoomasolulinja (U2OS-CRISPR-CRISPR-TPR-SNAP) sisältää CRISPR:llä muunnetun TPR-SNAP-fusion, joka mahdollistaa TPR-ydinkoriproteiinin fluoresoivan ja kemiallisen merkinnän. Konstruktio on stabiilisti integroitu. Tämä luokitus koskee vain Saksaa, ja se voi poiketa muualla.

## Biomolekyyli tiedot

**Protein expression** TPR, SNAP-tag

## Käsittely

**Culture Medium** McCoy's 5a, w: 3,0 g/l glukoosia, w: vakaa glutamiini, w: 2,0 mM natriumpyruvaattia, w: 2,2 g/l NaHCO<sub>3</sub> (Cytionin artikkelinumero 820200a)

**Supplements** Täydennetään elatusainetta 10 % FBS:llä, 3,0 g/l glukoosilla, stabiililla glutamiinilla, 2,0 mM natriumpyruvaatilla, 2,2 g/l NaHCO<sub>3</sub>:lla, 1 % NEAA:lla

**Dissociation Reagent** Accutase

**Doubling time** noin 24–36 tuntia

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

**Subculturing** Poista vanha väliaine tarttuneista soluista ja pese ne PBS:llä, josta puuttuu kalsiumia ja magnesiumia. Käytä T25-pulloissa 3-5 ml PBS:ää ja T75-pulloissa 5-10 ml. Peitä sitten solut kokonaan Accutase-valmisteella, käyttäen 1-2 ml T25-pulloissa ja 2,5 ml T75-pulloissa. Anna solujen inkuboitua huoneenlämmössä 8-10 minuuttia solujen irtoamiseksi. Inkuboinnin jälkeen solut sekoitetaan varovasti 10 ml:n väliaineella niiden resuspendoimiseksi ja sentrifugoidaan sitten 300xg:n nopeudella 3 minuutin ajan. Hävitä supernatantti, suspendoi solut uudelleen tuoreessa väliaineessa ja siirrä ne uusiin pulloihin, jotka sisältävät jo tuoretta väliaineita.

**Split ratio** 1-3

**Seeding density**  $1-3 \times 10^4$  solua/cm<sup>2</sup>

**Fluid renewal** 2-3 kertaa viikossa

**Freeze medium** Kryosäilytysmediaana käytämme täydellistä kasvualustaa (mukaan lukien FBS) + 10 % DMSO:ta riittävän sulatuksen jälkeisen elinkelpoisuuden varmistamiseksi tai CM-1:tä (Cytionin luettelonumero 800100), joka sisältää optimoituja osmoprotectantteja ja metabolisia stabilisaattoreita, jotka parantavat elpymistä ja vähentävät kryosäilytyksen aiheuttamaa stressiä.

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

1. Varmista, että injektiopullo pysyy syväjäädetyttynä toimitettaessa, sillä solut kuljetetaan kuivajäädessä, jotta optimaalinen lämpötila säilyy kuljetuksen aikana.
2. Vastaanottaessa kryopullo joko säilytetään välittömästi alle -150 °C:n lämpötilassa solujen eheyden säilyttämiseksi tai edetään vaiheeseen 3, jos tarvitaan välitöntä viljelyä.
3. Välitöntä viljelyä varten sulata injektiopullo nopeasti upottamalla se 37 °C:n vesihauteeseen, jossa on puhdasta vettä ja antimikrobista ainetta, ja sekoittamalla sitä varovasti 40-60 sekunnin ajan, kunnes jäädästä on jäljellä pieni jäämöhkäle.
4. Suorita kaikki seuraavat vaiheet steriileissä olosuhteissa virtaushupussa ja desinfioi kryopullo 70-prosenttisellä etanolilla ennen avaamista.
5. Avaa desinfioitu injektiopullo varovasti ja siirrä solususpensio 15 ml:n sentrifugiputkeen, joka sisältää 8 ml huoneenlämpöistä elatusainetta, varovasti sekoittaen.
6. Sentrifugoi seosta 300 x g:n voimakkuudella 3 minuutin ajan solujen erottamiseksi ja hävitä varovasti supernatantti, joka sisältää jäännöspakastusmediumia.
7. Suspendoidaan solupelletti varovasti uudelleen 10 ml:aan tuoretta elatusainetta. Jos solut ovat tarttuvaa, jaa suspensio kahden T25-kolvin kesken; jos kyseessä ovat suspensioviljelmät, siirrä kaikki väliaine yhteen T25-kolviin solujen tehokkaan vuorovaikutuksen ja kasvun edistämiseksi.
8. Noudata vakiintuneita aliviljelyprotokollia solulinjan jatkuvan kasvun ja ylläpidon varmistamiseksi ja luotettavien kokeellisten tulosten varmistamiseksi.

**Incubation  
Atmosphere**

37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ , kostutettu ilmakehä.

**Flask Coating**

Ei mitään

**Freezing  
Procedure**

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäädessä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

**Shipping  
Conditions**

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäädessä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

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

### Storage Conditions

Pitkäaikaissäilytystä varten injektiopullot asetetaan höyryfaasissa olevaan nestemäiseen tyypeen noin -150 - -196 °C:een. Säilytys -80 °C:ssa on hyväksyttävää vain lyhyenä välivaiheena ennen siirtoa nestemäiseen tyypeen.

## Laadunvalvonta / Geneettinen profiili / HLA

### Sterility

Mykoplasmakontaminaatio suljetaan pois sekä PCR-pohjaisilla määrittelyillä että luminesenssiin perustuvilla mykoplasman osoitusmenetelmillä.

Bakteeri-, sieni- tai hiivakontaminaation välttämiseksi soluviljelmät tarkastetaan päivittäin silmämääräisesti.