

Cellule U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667**Informazioni generali****Description**

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP è una linea cellulare di osteosarcoma umano modificata genomicamente derivata dalle cellule U2OS in cui il gene TPR (Translocated Promoter Region) endogeno è stato modificato utilizzando la tecnologia CRISPR/Cas9 per codificare un tag SNAP in-frame. Il TPR è una grande nucleoporina a spirale che si localizza nel nucleo sul lato nucleoplasmatico del complesso dei pori nucleari (NPC). Contrassegnando il TPR nel suo locus endogeno, la proteina di fusione viene espressa sotto il controllo regolatorio nativo, preservando i livelli di espressione fisiologica e mantenendo il corretto inserimento nella struttura del nucleo.

Il tag SNAP consente la marcatura covalente di TPR con substrati fluorescenti coniugati con benzilguanina in cellule vive o fissate, consentendo una visualizzazione altamente specifica e stabile. Nelle cellule U2OS-CRISPR-TPR-SNAP, il TPR marcato mostra una caratteristica distribuzione puntiforme ad anello sull'involucro nucleare, corrispondente alle strutture del nucleo associate all'NPC. Questo sistema è particolarmente adatto per la microscopia a fluorescenza quantitativa, l'imaging a super risoluzione, la marcatura pulse-chase e gli studi dinamici sull'assemblaggio e il ricambio del nucleo. La morfologia piatta e i nuclei di grandi dimensioni delle cellule U2OS facilitano l'imaging ad alta risoluzione delle strutture associate all'involucro nucleare.

Il TPR svolge un ruolo fondamentale nell'esportazione dell'mRNA, nella regolazione del trasporto nucleare, nell'organizzazione della cromatina alla periferia nucleare e nell'organizzazione spaziale del genoma. Il TPR è anche implicato nella formazione di sottocompartimenti legati al trasporto nucleare e nell'esclusione dell'eterocromatina dalle regioni associate ai pori nucleari. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP fornisce un modello fisiologicamente rilevante per analizzare l'architettura e le dinamiche del basket nucleare, studiare i meccanismi di traffico nucleocitoplasmatico e studiare le interazioni della cromatina associate all'involucro nucleare in condizioni di espressione endogena.

Organism Umano**Tissue** Osso**Disease** Osteosarcoma**Metastatic site** Sede del tumore primario (osso)**Applications** Biologia del "cestello" nucleare; esportazione dell'mRNA mediata dal TPR; regolazione del trasporto nucleocitoplasmatico; organizzazione della cromatina alla periferia del nucleo; sottocompartimenti del trasporto nucleare; organizzazione spaziale del genoma; microscopia a super-risoluzione; marcatura SNAP con tecnica pulse-chase; esclusione dell'eterocromatina dalle regioni associate ai pori**Caratteristiche****Age** 15 anni**Gender** Donna

Cellule U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Ethnicity	Caucasico
Morphology	Simile all'epitelio
Cell type	Cellule epiteliali (osteosarcoma)
Growth properties	Aderente

Dati normativi

Citation	U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (numero di catalogo Cytion 300667)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	Non assegnato (derivato di U2OS modificato con CRISPR; U2OS parentale CVCL_0042)
Depositor	Il laboratorio Ellenberg (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Questa linea cellulare di osteosarcoma umano (U2OS-CRISPR-TPR-SNAP) contiene una fusione TPR-SNAP ingegnerizzata con CRISPR che consente l'etichettatura fluorescente e chimica della proteina TPR nuclear basket. Il costrutto è integrato in modo stabile. Questa classificazione si applica solo in Germania e può variare altrove.

Dati biomolecolari

Protein expression	TPR, etichetta SNAP
---------------------------	---------------------

Manipolazione

Culture Medium	McCoys 5a, w: 3,0 g/L Glucosio, w: Glutamina stabile, w: 2,0 mM Sodio piruvato, w: 2,2 g/L NaHCO ₃ (articolo Cytion numero 820200a)
Supplements	Integrare il terreno di coltura con 10% FBS, 3,0 g/L di glucosio, Glutamina stabile, 2,0 mM di piruvato di sodio, 2,2 g/L di NaHCO ₃ , 1% di NEAA
Dissociation Reagent	Accutase

Cellule U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Doubling time circa da 24 a 36 ore

Subculturing Rimuovere il vecchio terreno dalle cellule aderenti e lavarle con PBS privo di calcio e magnesio. Per le fiasche T25, utilizzare 3-5 ml di PBS e per le fiasche T75, 5-10 ml. Quindi, coprire completamente le cellule con Accutase, utilizzando 1-2 ml per le fiasche T25 e 2,5 ml per le fiasche T75. Lasciare incubare le cellule a temperatura ambiente per 8-10 minuti per staccarle. Dopo l'incubazione, mescolare delicatamente le cellule con 10 ml di terreno per risospenderle, quindi centrifugare a 300xg per 3 minuti. Scartare il surnatante, risospendere le cellule in terreno fresco e trasferirle in nuove fiasche contenenti terreno fresco.

Split ratio da 1 a 3

Seeding density da 1 a 3×10^4 cellule/cm²

Fluid renewal da 2 a 3 volte alla settimana

Freeze medium Come terreno di crioconservazione, utilizziamo un terreno di crescita completo (incluso FBS) + 10% DMSO per un'adeguata vitalità post-scongelo, o CM-1 (numero di catalogo Cytion 800100), che include osmoprotettori e stabilizzatori metabolici ottimizzati per migliorare il recupero e ridurre lo stress crio-indotto.

Cellule U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Thawing and Culturing Cells

1. Verificare che la fiala rimanga profondamente congelata al momento della consegna, poiché le cellule vengono spedite con ghiaccio secco per mantenere le temperature ottimali durante il trasporto.
2. Al ricevimento, conservare immediatamente la criovial a temperature inferiori a -150°C per garantire la conservazione dell'integrità cellulare, oppure procedere al punto 3 se è necessaria una coltura immediata.
3. Per la coltura immediata, scongelare rapidamente la fiala immergendola in un bagno d'acqua a 37°C con acqua pulita e un agente antimicrobico, agitando delicatamente per 40-60 secondi finché non rimane un piccolo grumo di ghiaccio.
4. Eseguire tutte le fasi successive in condizioni di sterilità in una cappa a flusso, disinfettando la criovial con etanolo al 70% prima dell'apertura.
5. Aprire con cautela la fiala disinfettata e trasferire la sospensione cellulare in una provetta da centrifuga da 15 ml contenente 8 ml di terreno di coltura a temperatura ambiente, mescolando delicatamente.
6. Centrifugare la miscela a 300 x g per 3 minuti per separare le cellule e scartare con cura il surnatante contenente il terreno di coltura residuo.
7. Risospendere delicatamente il pellet cellulare in 10 ml di terreno di coltura fresco. Per le cellule aderenti, dividere la sospensione tra due fiasche di coltura T25; per le colture in sospensione, trasferire tutto il terreno in una fiasca T25 per promuovere l'interazione e la crescita delle cellule.
8. Attenersi ai protocolli di subcoltura stabiliti per la crescita e il mantenimento continui della linea cellulare, garantendo risultati sperimentali affidabili.

Incubation Atmosphere

37°C, 5% CO_2 , atmosfera umidificata.

Flask Coating

Nessuno

Freezing Procedure

Le linee cellulari crioconservate vengono spedite su ghiaccio secco in confezioni isolate e convalidate, con una quantità di refrigerante sufficiente a mantenere circa -78 °C durante il trasporto. Al ricevimento, ispezionare immediatamente il contenitore e trasferire immediatamente le fiale in un luogo di conservazione appropriato.

Shipping Conditions

Le linee cellulari crioconservate vengono spedite su ghiaccio secco in confezioni isolate e convalidate, con una quantità di refrigerante sufficiente a mantenere circa -78 °C durante il trasporto. Al ricevimento, ispezionare immediatamente il contenitore e trasferire immediatamente le fiale in un luogo di conservazione appropriato.

Cellule U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Storage Conditions

Per la conservazione a lungo termine, porre le fiale in azoto liquido in fase vapore a una temperatura compresa tra -150 e -196 °C circa. La conservazione a -80 °C è accettabile solo come breve fase intermedia prima del trasferimento in azoto liquido.

Controllo di qualità / Profilo genetico / HLA

Sterility

La contaminazione da micoplasma viene esclusa utilizzando sia saggi basati sulla PCR sia metodi di rilevamento del micoplasma basati sulla luminescenza.

Per garantire l'assenza di contaminazione batterica, fungina o da lieviti, le colture cellulari sono sottoposte a ispezioni visive quotidiane.