

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-cellen | 300667

Algemene informatie

Description

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP is een genoom-bewerkte menselijke osteosarcoomcellijn afgeleid van U2OS-cellen waarin het endogene TPR-gen (Translocated Promoter Region) is gemodificeerd met behulp van CRISPR/Cas9-technologie om een in-frame SNAP-tag te coderen. TPR is een groot coiled-coil nucleoporine dat zich lokaliseert in de nucleaire mand aan de nucleoplasmatische kant van het nucleaire poriëncomplex (NPC). Door TPR op zijn endogene locus te taggen, wordt het fusie-eiwit onder natuurlijke regulerende controle tot expressie gebracht, waardoor de fysiologische expressieniveaus behouden blijven en de juiste opname in de nucleaire mandstructuur behouden blijft.

De SNAP-tag maakt covalente labeling van TPR mogelijk met benzylguanine-geconjugeerde fluorescerende substraten in levende of gefixeerde cellen, waardoor een zeer specifieke en stabiele visualisatie mogelijk is. In U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-cellen vertoont gelabeld TPR een karakteristieke puntvormige ringvormige verdeling aan de kernmembraan, die overeenkomt met NPC-geassocieerde nucleaire mandstructuren. Dit systeem is zeer geschikt voor kwantitatieve fluorescentiemicroscopie, superresolutiebeeldvorming, pulse-chase-labeling en dynamische studies van de assemblage en omzetting van de nucleaire mand. De vlakke morfologie en grote kernen van U2OS-cellen vergemakkelijken beeldvorming met hoge resolutie van structuren die geassocieerd zijn met de kernmembraan.

TPR speelt een cruciale rol bij mRNA-export, regulering van nucleair transport, chromatine-organisatie aan de kernperiferie en ruimtelijke genoomorganisatie. TPR is ook betrokken bij de vorming van nucleair transportgerelateerde subcompartimenten en bij de uitsluiting van heterochromatine uit nucleaire poriëngerelateerde regio's. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP biedt een fysiologisch relevant model voor het ontleden van de architectuur en dynamica van de nucleaire mand, het onderzoeken van nucleocytoplasmatische transportmechanismen en het bestuderen van nucleaire envelop-gerelateerde chromatine-interacties onder endogene expressieomstandigheden.

Organism Mens

Tissue Bot

Disease Osteosarcoom

Kenmerken

Age 15 jaar

Gender Vrouw

Ethnicity Kaukasisch

Morphology Epitheelachtig

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-cellen | 300667

Growth properties Aanhangend

Regelgevende gegevens

Citation U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (Cytion catalogusnummer 300667)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

Depositor Het Ellenberg Lab (EMBL)

GMO Status GMO-S1: Deze menselijke osteosarcoomcellijn (U2OS-CRISPR-TPR-SNAP) bevat een CRISPR-ingebouwde TPR-SNAP fusie die fluorescente en chemische labeling van het TPR-kernmandeiwit mogelijk maakt. Het construct is stabiel geïntegreerd. Deze classificatie is alleen van toepassing binnen Duitsland en kan elders afwijken.

Biomoleculaire gegevens

Protein expression TPR, SNAP-tag

Omgaan met

Culture Medium McCoys 5a, w: 3,0 g/L Glucose, w: stabiel Glutamine, w: 2,0 mM Natriumpyruvaat, w: 2,2 g/L NaHCO₃ (Cytion artikelnummer 820200a)

Supplements Vul het medium aan met 10% FBS, 3,0 g/L Glucose, stabiele Glutamine, 2,0 mM Natriumpyruvaat, 2,2 g/L NaHCO₃, 1% NEAA

Dissociation Reagent Accutase

Subculturing Verwijder het oude medium van de adherente cellen en was ze met PBS zonder calcium en magnesium. Gebruik voor T25-flesjes 3-5 ml PBS en voor T75-flesjes 5-10 ml. Bedek de cellen vervolgens volledig met Accutase, met 1-2 ml voor T25-flesjes en 2,5 ml voor T75-flesjes. Laat de cellen gedurende 8-10 minuten bij kamertemperatuur incuberen om ze los te maken. Na incubatie de cellen voorzichtig mengen met 10 ml medium om ze te resuspenden en vervolgens centrifugereren bij 300xg gedurende 3 minuten. Gooi het supernatant weg, resuspendeer de cellen in vers medium en breng ze over in nieuwe kolven die al vers medium bevatten.

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-cellen | 300667

Freeze medium

Als cryoconserveringsmedium gebruiken we volledig groeimedium (inclusief FBS) + 10% DMSO voor voldoende levensvatbaarheid na het ontdooien, of CM-1 (Cytion catalogusnummer 800100), dat geoptimaliseerde osmoprotectanten en metabolische stabilisatoren bevat om het herstel te verbeteren en door cryo geïnduceerde stress te verminderen.

Thawing and Culturing Cells

1. Controleer of de flacon bij levering diepgevroren blijft, aangezien de cellen op droog ijs worden verzonden om optimale temperaturen tijdens het transport te behouden.
2. Bewaar het cryoflesje na ontvangst onmiddellijk bij temperaturen lager dan $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ om de integriteit van de cellen te behouden, of ga verder met stap 3 als onmiddellijke kweek vereist is.
3. Voor onmiddellijke kweek: ontdooi de flacon snel door deze onder te dompelen in een waterbad van $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ met schoon water en een antimicrobieel middel, waarbij u 40-60 seconden zachtjes schudt totdat er een klein ijsklontje overblijft.
4. Voer alle volgende stappen uit onder steriele omstandigheden in een stromingskap en desinfecteer de cryoflacon met 70% ethanol voordat deze wordt geopend.
5. Open voorzichtig de gedesinfecteerde flacon en breng de celsuspensie over in een centrifugebuis van 15 ml met 8 ml kweekmedium op kamertemperatuur en meng voorzichtig.
6. Centrifugeer het mengsel gedurende 3 minuten bij $300 \times g$ om de cellen te scheiden en gooi het supernatant met resterend vriesmedium voorzichtig weg.
7. Resuspendeer de celpellet voorzichtig in 10 ml vers kweekmedium. Verdeel voor adherente cellen de suspensie over twee T25-kweekkolven; breng voor suspensiekweken al het medium over in één T25-kweekkolf om effectieve celinteractie en -groei te bevorderen.
8. Houd u aan de vastgestelde subcultuurprotocollen voor continue groei en onderhoud van de cellijn, om betrouwbare experimentele resultaten te garanderen.

Incubation Atmosphere

37°C , 5% CO_2 , bevochtigde atmosfeer.

Flask Coating

Geen

Freezing Procedure

Gecryopreserveerde cellijnen worden verzonden op droog ijs in gevalideerde, geïsoleerde verpakkingen met voldoende koelmiddel om gedurende het transport ongeveer $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ te handhaven. Inspecteer de verpakking onmiddellijk na ontvangst en breng de flacons onverwijld over naar de juiste opslagplaats.

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-cellen | 300667

Shipping Conditions

Gecryopreserveerde cellijnen worden verzonden op droog ijs in gevalideerde, geïsoleerde verpakkingen met voldoende koelmiddel om gedurende het transport ongeveer -78 °C te handhaven. Inspecteer de verpakking onmiddellijk na ontvangst en breng de flacons onverwijld over naar de juiste opslagplaats.

Storage Conditions

Voor langdurige bewaring plaatst u flesjes in vloeibare stikstof in dampfase bij ongeveer -150 tot -196 °C. Opslag bij -80 °C is alleen aanvaardbaar als korte tussenstap vóór overbrenging naar vloeibare stikstof.

Kwaliteitscontrole / Genetisch profiel / HLA

Sterility

Mycoplasma-verontreiniging wordt uitgesloten met zowel PCR-gebaseerde testen als op luminescentie gebaseerde mycoplasma-detectiemethoden.

Om er zeker van te zijn dat er geen besmetting is met bacteriën, schimmels of gisten, worden de celculturen dagelijks onderworpen aan visuele inspecties.