

**U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-celler | 300667****Generell informasjon****Description**

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP er en genomredigert human osteosarkomcellelinje avledet fra U2OS-celler, hvor det endogene TPR-genet (Translocated Promoter Region) er modifisert ved hjelp av CRISPR/Cas9-teknologi for å kode for en in-frame SNAP-tag. TPR er et stort coiled-coil-nukleoporin som lokaliseres til nukleærkurven på nukleoplasmatiske side av nukleærporekomplekset (NPC). Ved å merke TPR på dets endogene locus, uttrykkes fusjonsproteinet under naturlig regulatorisk kontroll, noe som bevarer fysiologiske ekspresjonsnivåer og opprettholder riktig inkorporering i nukleærkurvestrukturen.

SNAP-taggen muliggjør kovalent merking av TPR med benzyguanin-konjugerte fluorescerende substrater i levende eller fikserte celler, noe som gir svært spesifikk og stabil visualisering. I U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-celler viser merket TPR en karakteristisk punktformet ringlignende fordeling ved kjernemembranen, som tilsvarer NPC-assosierte nukleære kurvstrukturer. Dette systemet er godt egnet for kvantitativ fluorescensmikroskopi, superoppløsningsavbildning, puls-jakt-merking og dynamiske studier av nukleær kurvsamling og omsetning. Den flate morfologien og de store kjernene i U2OS-celler muliggjør høyoppløsningsavbildning av strukturer assosiert med kjernemembranen.

TPR spiller en avgjørende rolle i mRNA-eksport, regulering av kjernetransport, kromatinorganisering ved kjernens periferi og romlig genomorganisering. TPR er også involvert i dannelsen av kjernetransportrelaterte underkompartimenter og i ekskludering av heterokromatin fra kjernens pore-assosierte regioner. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP gir en fysiologisk relevant modell for å dissekere arkitekturen og dynamikken i nukleær kurv, undersøke nukleocytoplasmatiske transportmekanismer og studere kromatininteraksjoner assosiert med kjernen under endogene ekspresjonsforhold.

**Organism** Menneskelig

**Tissue** Bein

**Disease** Osteosarkom

**Kjennetegn**

**Age** 15 år

**Gender** Kvinne

**Ethnicity** Kaukasisk

**Morphology** Epitel-lignende

**Growth properties** Vedhengende

**Regulatoriske data**

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

<b>Citation</b>	U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (Cytion-katalognummer 300667)
<b>Biosafety level</b>	1
<b>NCBI_TaxID</b>	9606
<b>Depositor</b>	Ellenberg-laboratoriet (EMBL)
<b>GMO Status</b>	GMO-S1: Denne humane osteosarkomcellelinjen (U2OS-CRISPR-TPR-SNAP) inneholder en CRISPR-konstruert TPR-SNAP-fusjon som muliggjør fluorescerende og kjemisk merking av TPR-kjernekurvproteinet. Konstruktet er stabilt integrert. Denne klassifiseringen gjelder bare i Tyskland og kan variere andre steder.

**Biomolekylære data**

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

**Håndtering**

<b>Culture Medium</b>	McCoy's 5a, m: 3,0 g/L glukose, m: stabil glutamin, m: 2,0 mM natriumpyruvat, m: 2,2 g/L NaHCO <sub>3</sub> (Cytion artikkelnummer 820200a)
<b>Supplements</b>	Suppler med 10 % FBS, 3,0 g/L glukose, stabil glutamin, 2,0 mM natriumpyruvat, 2,2 g/L NaHCO <sub>3</sub> , 1 % NEAA
<b>Dissociation Reagent</b>	Accutase
<b>Subculturing</b>	Fjern det gamle mediet fra de adherente cellene, og vask dem med PBS uten kalsium og magnesium. Bruk 3-5 ml PBS for T25-kolber og 5-10 ml for T75-kolber. Dekk deretter cellene helt med Accutase, med 1-2 ml for T25-kolber og 2,5 ml for T75-kolber. La cellene inkubere i romtemperatur i 8-10 minutter for å løsne dem. Etter inkubasjon blandes cellene forsiktig med 10 ml medium for å resuspendere dem, og sentrifuger deretter ved 300xg i 3 minutter. Kast supernatanten, resuspendere cellene i nytt medium, og overfør dem til nye kolber som allerede inneholder nytt medium.
<b>Freeze medium</b>	Som kryopreserveringsmedium bruker vi komplett vekstmedium (inkludert FBS) + 10 % DMSO for tilstrekkelig levedyktighet etter optining, eller CM-1 (Cytion-katalognummer 800100), som inneholder optimaliserte osmobeskyttende midler og metabolske stabilisatorer for å øke utvinningen og redusere kryoinduisert stress.

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

1. Kontroller at hetteglasset er dypfrysst ved levering, ettersom cellene sendes på tørris for å opprettholde optimale temperaturer under transport.
2. Ved mottak skal hetteglasset enten oppbevares umiddelbart ved temperaturer under  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  for å sikre at cellenes integritet bevares, eller gå videre til trinn 3 hvis umiddelbar dyrking er nødvendig.
3. Ved umiddelbar dyrking tiner du hetteglasset raskt ved å senke det ned i et  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  varmt vannbad med rent vann og et antimikrobielt middel, og røre forsiktig i 40-60 sekunder til det blir en liten isklump igjen.
4. Utfør alle påfølgende trinn under sterile forhold i en strømningshette, og desinfiser kryoflasken med 70 % etanol før du åpner den.
5. Åpne det desinfiserte hetteglasset forsiktig, og overfør cellesuspensjonen til et 15 ml sentrifugerør som inneholder 8 ml romtemperert dyrkingsmedium, og bland forsiktig.
6. Sentrifuger blandingen ved  $300 \times g$  i 3 minutter for å separere cellene, og kast supernatanten som inneholder rester av frysemedium, forsiktig.
7. Resuspender cellepelletten forsiktig i 10 ml nytt dyrkingsmedium. For adherente celler, del suspensjonen mellom to T25-kulturkolber; for suspensjonskulturer, overfør alt mediet til én T25-kolbe for å fremme effektiv celleinteraksjon og vekst.
8. Følg etablerte subkulturprotokoller for fortsatt vekst og vedlikehold av cellelinjen, noe som sikrer pålitelige eksperimentelle resultater.

**Incubation  
Atmosphere**

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , befuktet atmosfære.

**Flask Coating**

Ingen

**Freezing  
Procedure**

Kryopreserverte cellelinjer sendes på tørris i validert, isolert emballasje med tilstrekkelig kjølemiddel til å opprettholde en temperatur på ca.  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  under hele transporten. Ved mottak skal beholderen inspiseres umiddelbart, og hetteglassene skal straks overføres til egnet lagringsplass.

**Shipping  
Conditions**

Kryopreserverte cellelinjer sendes på tørris i validert, isolert emballasje med tilstrekkelig kjølemiddel til å opprettholde en temperatur på ca.  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  under hele transporten. Ved mottak skal beholderen inspiseres umiddelbart, og hetteglassene skal straks overføres til egnet lagringsplass.

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

### Storage Conditions

For langtidsoppbevaring plasseres hetteglassene i flytende nitrogen i dampfase ved ca. -150 til -196 °C. Lagring ved -80 °C er kun akseptabelt som et kort mellomtrinn før overføring til flytende nitrogen.

## Kvalitetskontroll / Genetisk profil / HLA

### Sterility

Mykoplasma-kontaminering utelukkes ved hjelp av både PCR-baserte analyser og luminescensbaserte metoder for påvisning av mykoplasma.

For å sikre at det ikke finnes bakterie-, sopp- eller gjærkontaminering, blir cellekulturene inspisert visuelt hver dag.