

Komórki U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667**Informacje ogólne****Description**

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP to zmodyfikowana genetycznie linia komórek ludzkiego osteosarcoma pochodząca z komórek U2OS, w której endogeny gen TPR (Translocated Promoter Region) został zmodyfikowany przy użyciu technologii CRISPR/Cas9 w celu zakodowania znacznika SNAP w ramce odczytu. TPR jest dużym białkiem nukleoporinowym o strukturze spiralnej, które lokalizuje się w koszyku jądrowym po stronie nukleoplazmatycznej kompleksu porów jądrowych (NPC). Dzięki oznaczeniu TPR w jego endogenicznym locus, białko fuzyjne jest wyrażane pod natywną kontrolą regulacyjną, zachowując fizjologiczne poziomy ekspresji i utrzymując prawidłowe włączenie do struktury koszyka jądrowego.

Znacznik SNAP umożliwia kowalencyjne znakowanie TPR substratami fluorescencyjnymi sprzężonymi z benzyloguaniną w żywych lub utrwalonych komórkach, co pozwala na wysoce specyficzną i stabilną wizualizację. W komórkach U2OS-CRISPR-TPR-SNAP znakowany TPR wykazuje charakterystyczny punktowy rozkład w kształcie pierścienia na otoczce jądrowej, odpowiadający strukturom koszyka jądrowego związanego z NPC. System ten dobrze nadaje się do ilościowej mikroskopii fluorescencyjnej, obrazowania w superrozdzielczości, znakowania metodą pulse-chase oraz dynamicznych badań dotyczących montażu i obrotu koszyka jądrowego. Płaska morfologia i duże jądra komórek U2OS ułatwiają obrazowanie w wysokiej rozdzielczości struktur związanych z otoczką jądrową.

TPR odgrywa kluczową rolę w eksporcie mRNA, regulacji transportu jądrowego, organizacji chromatyny na obrzeżach jądra komórkowego oraz przestrzennej organizacji genomu. TPR bierze również udział w tworzeniu podkomórek związanych z transportem jądrowym oraz w wykluczaniu heterochromatyny z regionów związanych z porami jądrowymi. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP stanowi fizjologicznie istotny model do analizy architektury i dynamiki koszyka jądrowego, badania mechanizmów transportu jądrowo-cytoplazmatycznego oraz badania interakcji chromatyny związanych z otoczką jądrową w warunkach endogenicznej ekspresji.

Organism Człowiek**Tissue** Kość**Disease** Mięsak kościopochodny**Metastatic site** Miejsce występowania guza pierwotnego (kość)

Applications Biologia koszyka jądrowego; eksport mRNA za pośrednictwem białka TPR; regulacja transportu jądrowo-cytoplazmatycznego; organizacja chromatyny na obrzeżach jądra; podkompartenty transportu jądrowego; przestrzenna organizacja genomu; mikroskopia superrozdzielcza; znakowanie metodą SNAP „pulse-chase”; wykluczenie heterochromatyny z obszarów związanych z porami

Charakterystyka**Age** 15 lat**Gender** Kobieta

Komórki U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667**Ethnicity** Kaukaski**Morphology** Podobny do nabłonka**Cell type** Komórki nabłonkowe (osteosarcoma)**Growth properties** Adherent**Dane regulacyjne****Citation** U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (numer katalogowy Cytion 300667)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** Nieprzypisane (odmiana komórek U2OS zmodyfikowana metodą CRISPR; komórki macierzyste U2OS CVCL_0042)**Depositor** Laboratorium Ellenberg (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Ta ludzka linia komórek kostniakomięsaka (U2OS-CRISPR-TPR-SNAP) zawiera zmodyfikowaną metodą CRISPR fuzję TPR-SNAP umożliwiającą fluorescencyjne i chemiczne znakowanie białka koszyka jądrowego TPR. Konstrukt jest stabilnie zintegrowany. Ta klasyfikacja ma zastosowanie tylko w Niemczech i może różnić się w innych krajach.**Dane biomolekularne****Protein expression** TPR, SNAP-tag**Obsługa****Culture Medium** McCoys 5a, w: 3,0 g/l glukozy, w: stabilna glutamina, w: 2,0 mM pirogronianu sodu, w: 2,2 g/l NaHCO₃ (numer artykułu Cytion 820200a)**Supplements** Uzupełnić pożywkę o 10% FBS, 3,0 g/l glukozy, stabilną glutaminę, 2,0 mM pirogronianu sodu, 2,2 g/l NaHCO₃, 1% NEAA**Dissociation Reagent** Accutase

Komórki U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667**Doubling time** ok. 24–36 godzin

Subculturing Usuń starą pożywkę z przylegających komórek i przemyj je PBS, który nie zawiera wapnia i magnezu. W przypadku kolb T25 należy użyć 3-5 ml PBS, a w przypadku kolb T75 5-10 ml. Następnie całkowicie pokryj komórki Accutase, używając 1-2 ml dla kolb T25 i 2,5 ml dla kolb T75. Pozwól komórkom inkubować w temperaturze pokojowej przez 8-10 minut, aby je oddzielić. Po inkubacji delikatnie wymieszaj komórki z 10 ml pożywki, aby ponownie je zawiesić, a następnie odwiruj przy 300xg przez 3 minuty. Odrzuć supernatant, ponownie zawiesić komórki w świeżej pożywce i przenieść je do nowych kolb zawierających już świeżą pożywkę.

Split ratio od 1 do 3**Seeding density** od 1 do 3×10^4 komórek/cm²**Fluid renewal** 2 do 3 razy w tygodniu

Freeze medium Jako pożywki do kriokonserwacji używamy kompletnej pożywki wzrostowej (w tym FBS) + 10% DMSO w celu zapewnienia odpowiedniej żywotności po rozmrożeniu lub CM-1 (numer katalogowy Cytion 800100), która zawiera zoptymalizowane osmoprotektanty i stabilizatory metaboliczne w celu zwiększenia regeneracji i zmniejszenia stresu wywołanego kriokonserwacją.

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

1. Upewnij się, że fiolka pozostaje głęboko zamrożona w momencie dostawy, ponieważ komórki są wysyłane w suchym lodzie, aby utrzymać optymalną temperaturę podczas transportu.
2. Po otrzymaniu należy natychmiast przechowywać fiolkę w temperaturze poniżej -150°C , aby zapewnić zachowanie integralności komórek, lub przejść do kroku 3, jeśli wymagana jest natychmiastowa hodowla.
3. W przypadku natychmiastowej hodowli należy szybko rozmrozić fiolkę, zanurzając ją w łaźni wodnej o temperaturze 37°C z czystą wodą i środkiem przeciwdrobnoustrojowym, delikatnie mieszając przez 40-60 sekund, aż pozostanie niewielka grudka lodu.
4. Wykonaj wszystkie kolejne kroki w sterylnych warunkach w kapturze przepływowej, dezynfekując fiolkę 70% etanolem przed otwarciem.
5. Ostrożnie otworzyć zdezynfekowaną fiolkę i przenieść zawiesinę komórek do 15 ml probówki wirówkowej zawierającej 8 ml podłoża hodowlanego o temperaturze pokojowej, delikatnie mieszając.
6. Wirować mieszaninę z prędkością $300 \times g$ przez 3 minuty w celu oddzielenia komórek i ostrożnie odrzucić supernatant zawierający pozostałości pożywki do zamrażania.
7. Delikatnie ponownie zawiesić osad komórek w 10 ml świeżego podłoża hodowlanego. W przypadku komórek przylegających, rozdzielić zawiesinę pomiędzy dwie kolby hodowlane T25; w przypadku hodowli zawiesinowych, przenieść całą pożywkę do jednej kolby T25 w celu promowania skutecznej interakcji i wzrostu komórek.
8. Przestrzegaj ustalonych protokołów podhodowli w celu ciągłego wzrostu i utrzymania linii komórkowej, zapewniając wiarygodne wyniki eksperymentów.

**Incubation
Atmosphere**

37°C , 5% CO_2 , nawilżona atmosfera.

Flask Coating

Brak

**Freezing
Procedure**

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiolkę do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Komórki U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Shipping Conditions

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiołki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Storage Conditions

W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiołki w ciekłym azocie w fazie lotnej w temperaturze od -150 do -196°C . Przechowywanie w temperaturze -80°C jest dopuszczalne tylko jako krótki etap przejściowy przed przeniesieniem do ciekłego azotu.

Kontrola jakości i analiza molekularna

Sterility

Zanieczyszczenie mykoplazmą jest wykluczane przy użyciu zarówno testów opartych na PCR, jak i metod wykrywania mykoplazmy opartych na luminescencji.

Aby upewnić się, że nie ma zanieczyszczenia bakteriami, grzybami lub drożdżami, hodowle komórkowe są poddawane codziennym kontrolom wizualnym.