Product sheet

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 endogenny 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 endogennym locus, białko fuzyjne jest wyrażane pod kontrolą naturalnych mechanizmów regulacyjnych, 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 tworzenia i wymiany 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 subkompartmentów 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

Charakterystyka

Age	15 lat
Gender	Kobieta
Ethnicity	Kaukaski
Morphology	Podobny do nabłonka
Growth properties	Adherent

Komórki U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Dane regulacyjne

Citation	U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (numer katalogowy Cytion 300667)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
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
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. Odrzucić supernatant, ponownie zawiesić komórki w świeżej pożywce i przenieść je do nowych kolb zawierających już świeżą pożywkę.
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 przepływowym, 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 x 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%$_{CO2}$, nawilżona atmosfera.

Flask Coating

W celu zapewnienia optymalnego przylegania i żywotności po rozmrożeniu zalecamy stosowanie **kolb lub płytek pokrytych kolagenem.**

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 fiolki 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 fiolki do odpowiedniego miejsca przechowywania.
Storage Conditions	W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiolki 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 / Profil genetyczny / HLA

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.