

**Células U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667****Informações gerais****Description**

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP é uma linha celular de osteossarcoma humano editada geneticamente, derivada de células U2OS, na qual o gene TPR (Translocated Promoter Region) endógeno foi modificado usando a tecnologia CRISPR/Cas9 para codificar uma etiqueta SNAP em quadro. O TPR é uma grande nucleoporina em espiral que se localiza na cesta nuclear no lado nucleoplasmático do complexo de poros nucleares (NPC). Ao marcar o TPR no seu locus endógeno, a proteína de fusão é expressa sob controle regulatório nativo, preservando os níveis de expressão fisiológica e mantendo a incorporação adequada na estrutura da cesta nuclear.

A etiqueta SNAP permite a marcação covalente do TPR com substratos fluorescentes conjugados com benzilguanina em células vivas ou fixas, permitindo uma visualização altamente específica e estável. Nas células U2OS-CRISPR-TPR-SNAP, o TPR marcado exibe uma distribuição pontilhada característica em forma de anel no envelope nuclear, correspondendo às estruturas da cesta nuclear associadas ao NPC. Este sistema é adequado para microscopia de fluorescência quantitativa, imagem de super-resolução, marcação pulse-chase e estudos dinâmicos da montagem e renovação da cesta nuclear. A morfologia plana e os núcleos grandes das células U2OS facilitam a imagem de alta resolução das estruturas associadas ao envelope nuclear.

O TPR desempenha papéis críticos na exportação de mRNA, regulação do transporte nuclear, organização da cromatina na periferia nuclear e organização espacial do genoma. O TPR também está implicado na formação de subcompartimentos relacionados ao transporte nuclear e na exclusão da heterocromatina das regiões associadas aos poros nucleares. O U2OS-CRISPR-TPR-SNAP fornece um modelo fisiologicamente relevante para dissecar a arquitetura e a dinâmica da cesta nuclear, investigar mecanismos de tráfego nucleocitoplasmático e estudar interações da cromatina associadas ao envelope nuclear em condições de expressão endógena.

**Organism** Humano**Tissue** Osso**Disease** Osteossarcoma**Caraterísticas****Age** 15 anos**Gender** Feminino**Ethnicity** Caucasiano**Morphology** De tipo epitelial**Growth properties** Aderente

**Células U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667****Dados regulamentares**

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>Citation</b>        | U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (número de catálogo Cytion 300667)  |
| <b>Biosafety level</b> | 1  |
| <b>NCBI_TaxID</b>      | 9606   |
| <b>Depositor</b>       | O Laboratório Ellenberg (EMBL)   |
| <b>GMO Status</b>      | GMO-S1: Esta linha celular de osteossarcoma humano (U2OS-CRISPR-TPR-SNAP) contém uma fusão TPR-SNAP com engenharia CRISPR que permite a marcação fluorescente e química da proteína do cesto nuclear TPR. A construção está integrada de forma estável. Esta classificação aplica-se apenas na Alemanha e pode ser diferente noutros países. |

**Dados biomoleculares**

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

**Manuseamento**

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| <b>Culture Medium</b>       | McCoy's 5a, com: 3,0 g/L de glucose, com: glutamina estável, com: 2,0 mM de piruvato de sódio, com: 2,2 g/L de NaHCO <sub>3</sub> (número de artigo Cytion 820200a)  |
| <b>Supplements</b>          | Suplementar o meio com 10% de FBS, 3,0 g/L de glucose, glutamina estável, 2,0 mM de piruvato de sódio, 2,2 g/L de NaHCO <sub>3</sub> , 1% de NEAA  |
| <b>Dissociation Reagent</b> | Accutase   |
| <b>Subculturing</b>         | Retirar o meio antigo das células aderentes e lavá-las com PBS sem cálcio e magnésio. Nos frascos T25, utilizar 3-5 ml de PBS e, nos frascos T75, 5-10 ml. Em seguida, cobrir completamente as células com Accutase, utilizando 1-2 ml para os frascos T25 e 2,5 ml para os frascos T75. Deixar as células incubar à temperatura ambiente durante 8-10 minutos para as destacar. Após a incubação, misturar suavemente as células com 10 ml de meio para as ressuspender e, em seguida, centrifugar a 300xg durante 3 minutos. Deitar fora o sobrenadante, ressuspender as células em meio fresco e transferi-las para novos frascos que já contenham meio fresco. |
| <b>Freeze medium</b>        | Como meio de criopreservação, utilizamos um meio de crescimento completo (incluindo FBS) + 10% DMSO para uma viabilidade pós-descongelamento adequada, ou CM-1 (número de catálogo Cytion 800100), que inclui osmoprotectores otimizados e estabilizadores metabólicos para melhorar a recuperação e reduzir o stress induzido pela crio.  |

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

### Thawing and Culturing Cells

1. Confirme que o frasco permanece profundamente congelado aquando da entrega, uma vez que as células são enviadas em gelo seco para manter as temperaturas ideais durante o transporte.
2. Após a receção, armazenar o frasco criogénico imediatamente a temperaturas inferiores a  $-150^{\circ}\text{C}$  para garantir a preservação da integridade celular, ou avançar para o passo 3 se for necessária uma cultura imediata.
3. Para uma cultura imediata, descongelar rapidamente o frasco imergindo-o num banho de água a  $37^{\circ}\text{C}$  com água limpa e um agente antimicrobiano, agitando suavemente durante 40-60 segundos até ficar um pequeno aglomerado de gelo.
4. Efetuar todos os passos subsequentes em condições estéreis numa capela de fluxo, desinfetando o frasco criogénico com etanol a 70% antes de o abrir.
5. Abrir cuidadosamente o frasco desinfetado e transferir a suspensão de células para um tubo de centrifugação de 15 ml contendo 8 ml de meio de cultura à temperatura ambiente, misturando suavemente.
6. Centrifugar a mistura a  $300 \times g$  durante 3 minutos para separar as células e eliminar cuidadosamente o sobrenadante que contém o meio de congelação residual.
7. Ressuspender suavemente o pellet de células em 10 ml de meio de cultura fresco. No caso de células aderentes, dividir a suspensão entre dois frascos de cultura T25; no caso de culturas em suspensão, transferir todo o meio para um frasco T25 para promover uma interação e um crescimento eficazes das células.
8. Cumprir os protocolos de subcultura estabelecidos para o crescimento e manutenção contínuos da linha celular, garantindo resultados experimentais fiáveis.

### Incubation Atmosphere

$37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , atmosfera humidificada.

### Flask Coating

Nenhum

### Freezing Procedure

As linhas celulares criopreservadas são expedidas em gelo seco em embalagens validadas e isoladas com refrigerante suficiente para manter aproximadamente  $-78^{\circ}\text{C}$  durante o transporte. Aquando da receção, inspecionar imediatamente o recipiente e transferir sem demora os frascos para um local de armazenamento adequado.

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

### Shipping Conditions

As linhas celulares criopreservadas são expedidas em gelo seco em embalagens validadas e isoladas com refrigerante suficiente para manter aproximadamente -78 °C durante o transporte. Aquando da receção, inspecionar imediatamente o recipiente e transferir sem demora os frascos para um local de armazenamento adequado.

### Storage Conditions

Para conservação a longo prazo, colocar os frascos em azoto líquido em fase de vapor a uma temperatura entre -150 e -196 °C. O armazenamento a -80 °C é aceitável apenas como um curto passo intermédio antes da transferência para azoto líquido.

## Controlo de qualidade / Perfil genético / HLA

### Sterility

A contaminação por micoplasma é excluída utilizando ensaios baseados em PCR e métodos de deteção de micoplasma baseados em luminescência.

Para garantir que não há contaminação bacteriana, fúngica ou de leveduras, as culturas de células são sujeitas a inspecções visuais diárias.