

Celule U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Informații generale

Description

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP este o linie celulară de osteosarcom uman editată genetic, derivată din celule U2OS, în care gena endogenă TPR (Translocated Promoter Region) a fost modificată folosind tehnologia CRISPR/Cas9 pentru a codifica o etichetă SNAP în cadru. TPR este o nucleoporină mare în formă de spirală care se localizează în coșul nuclear pe partea nucleoplasmică a complexului porilor nucleari (NPC). Prin etichetarea TPR la locusul său endogen, proteina de fuziune este exprimată sub controlul regulator nativ, păstrând nivelurile de expresie fiziologică și menținând incorporarea corespunzătoare în structura coșului nuclear.

Eticheta SNAP permite marcarea covalentă a TPR cu substraturi fluorescente conjugate cu benzilguanină în celule vii sau fixate, permițând o vizualizare foarte specifică și stabilă. În celulele U2OS-CRISPR-TPR-SNAP, TPR marcat prezintă o distribuție caracteristică punctiformă în formă de inel la nivelul învelișului nuclear, corespunzând structurilor coșului nuclear asociate NPC. Acest sistem este foarte potrivit pentru microscopie fluorescentă cantitativă, imagistică de super-rezoluție, marcarea pulse-chase și studii dinamice ale asamblării și rotației coșului nuclear. Morfologia plată și nucleeele mari ale celulelor U2OS facilitează imagistica de înaltă rezoluție a structurilor asociate învelișului nuclear.

TPR joacă un rol esențial în exportul ARNm, reglarea transportului nuclear, organizarea cromatinei la periferia nucleară și organizarea spațială a genomului. TPR este, de asemenea, implicat în formarea subcompartimentelor legate de transportul nuclear și în excluderea heterocromatinei din regiunile asociate porilor nucleari. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP oferă un model fiziologic relevant pentru disecarea arhitecturii și dinamicii coșului nuclear, investigarea mecanismelor de trafic nucleocitoplasmic și studierea interacțiunilor cromatinei asociate cu învelișul nuclear în condiții de expresie endogenă.

Organism

Om

Tissue

Os

Disease

Osteosarcom

Metastatic site

Localizarea tumorii primare (os)

Applications

Biologia coșului nuclear; exportul de ARNm mediat de TPR; reglarea transportului nucleocitoplasmic; organizarea cromatinei la periferia nucleară; subcompartimentele transportului nuclear; organizarea spațială a genomului; microscopia de super-rezoluție; marcarea prin metoda „pulse-chase” cu SNAP; excluderea heterocromatinei din regiunile asociate porilor

Caracteristici

Age

15 ani

Gender

Femei

Ethnicity

Caucasian

Celule U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667**Morphology** De tip epitelial**Cell type** Celule epiteliale (osteosarcom)**Growth properties** Aderent**Date de reglementare****Citation** U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (număr de catalog Cytion 300667)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** Neatribuit (derivat al liniei U2OS modificat prin CRISPR; linia parentală U2OS CVCL_0042)**Depositor** Laboratorul Ellenberg (EMBL)**GMO Status** OMG-S1: Această linie celulară de osteosarcom uman (U2OS-CRISPR-TPR-SNAP) conține o fuziune TPR-SNAP modificată prin CRISPR care permite marcarea fluorescentă și chimică a proteinei TPR de coș nuclear. Construcția este integrată stabil. Această clasificare se aplică numai în Germania și poate diferi în alte țări.**Date biomoleculare****Protein expression** TPR, SNAP-tag**Manipulare****Culture Medium** McCoys 5a, cu: 3,0 g/L glucoză, cu: glutamină stabilă, cu: 2,0 mM piruvat de sodiu, cu: 2,2 g/L NaHCO₃ (numărul articolului Cytion 820200a)**Supplements** Suplimentați mediul cu 10% FBS, 3,0 g/L glucoză, glutamină stabilă, 2,0 mM piruvat de sodiu, 2,2 g/L NaHCO₃, 1% NEAA**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** aproximativ 24–36 de ore

Celule U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Subculturing Îndepărtați mediul vechi de pe celulele aderente și spălați-le cu PBS care nu conține calciu și magneziu. Pentru flacoanele T25, se utilizează 3-5 ml de PBS, iar pentru flacoanele T75, 5-10 ml. Apoi, se acoperă celulele complet cu Accutase, folosind 1-2 ml pentru flacoanele T25 și 2,5 ml pentru flacoanele T75. Lăsați celulele la incubare la temperatura camerei timp de 8-10 minute pentru a le detașa. După incubare, amestecați ușor celulele cu 10 ml de mediu pentru a le resuspenda, apoi centrifugați la 300xg timp de 3 minute. Aruncați supernatantul, resuspendați celulele în mediu proaspăt și transferați-le în flacoane noi care conțin deja mediu proaspăt.

Split ratio 1-3

Seeding density 1 până la 3×10^4 celule/cm²

Fluid renewal de 2 până la 3 ori pe săptămână

Freeze medium Ca mediu de crioconservare, folosim mediu de creștere complet (inclusiv FBS) + 10% DMSO pentru o viabilitate adecvată după dezghețare sau CM-1 (număr de catalog Cytion 800100), care include osmoprotectanți optimizați și stabilizatori metabolici pentru a spori recuperarea și a reduce stresul indus de criogenie.

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

1. Confirmați că flaconul rămâne profund înghețat la livrare, deoarece celulele sunt expediate pe gheață carbonică pentru a menține temperaturi optime în timpul transportului.
2. La primire, fie depozitați crioviola imediat la temperaturi sub -150 °C pentru a asigura păstrarea integrității celulare, fie treceți la etapa 3 dacă este necesară cultivarea imediată.
3. Pentru cultivarea imediată, dezghețați rapid flaconul prin scufundarea acestuia într-o baie de apă la 37 °C cu apă curată și un agent antimicrobian, agitându-l ușor timp de 40-60 de secunde până când rămâne o mică aglomerare de gheață.
4. Se efectuează toate etapele ulterioare în condiții sterile, într-o hotă cu flux, dezinfectând crioviola cu etanol 70% înainte de deschidere.
5. Se deschide cu grijă flaconul dezinfectat și se transferă suspensia celulară într-un tub de centrifugare de 15 ml care conține 8 ml de mediu de cultură la temperatura camerei, amestecând ușor.
6. Se centrifughează amestecul la 300 x g timp de 3 minute pentru a separa celulele și se aruncă cu grijă supernatantul care conține mediul de congelare rezidual.
7. Se resuspendă ușor peletul celular în 10 ml de mediu de cultură proaspăt. Pentru celulele aderente, împărțiți suspensia între două flacoane de cultură T25; pentru culturile în suspensie, transferați tot mediul într-un flacon T25 pentru a promova interacțiunea și creșterea celulară eficientă.
8. Respectați protocoalele de subcultură stabilite pentru creșterea și menținerea continuă a liniei celulare, asigurând rezultate experimentale fiabile.

**Incubation
Atmosphere**

37°C, 5% CO_2 , atmosferă umidificată.

Flask Coating

Niciuna

**Freezing
Procedure**

Liniile celulare crioconservate sunt expediate pe gheață carbonică în ambalaje izolate, validate, cu suficient agent frigorific pentru a menține aproximativ -78 °C pe toată durata transportului. La primire, se inspectează imediat recipientul și se transferă fără întârziere fiolele în depozitul corespunzător.

**Shipping
Conditions**

Liniile celulare crioconservate sunt expediate pe gheață carbonică în ambalaje izolate, validate, cu suficient agent frigorific pentru a menține aproximativ -78 °C pe toată durata transportului. La primire, se inspectează imediat recipientul și se transferă fără întârziere fiolele în depozitul corespunzător.

Celule U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Storage Conditions

Pentru conservarea pe termen lung, flacoanele se plasează în azot lichid în fază de vapori la o temperatură cuprinsă între -150 și -196 °C. Păstrarea la -80 °C este acceptabilă doar ca o scurtă etapă intermediară înainte de transferul în azot lichid.

Controlul calității / Profil genetic / HLA

Sterility

Contaminarea cu micoplasmă este exclusă utilizând atât teste bazate pe PCR, cât și metode de detectare a micoplasmei bazate pe luminescență.

Pentru a se asigura că nu există contaminare bacteriană, fungică sau de drojdie, culturile celulare sunt supuse unor inspecții vizuale zilnice.