

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-celler | 300667**Allmän information****Description**

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP är en genredigerad human osteosarkomcellinje som härrör från U2OS-celler, där det endogena TPR-genet (Translocated Promoter Region) har modifierats med hjälp av CRISPR/Cas9-teknik för att koda en in-frame SNAP-tag. TPR är ett stort spiralformat nukleoporin som lokaliseras till kärnkorgen på den nukleoplasmatiska sidan av kärnporekomplexet (NPC). Genom att märka TPR vid dess endogena locus uttrycks fusionsproteinet under naturlig regulatorisk kontroll, vilket bevarar fysiologiska expressionsnivåer och upprätthåller korrekt inkorporering i kärnkorgen.

SNAP-taggen möjliggör kovalent märkning av TPR med bensylguaninkonjugerade fluorescerande substrat i levande eller fixerade celler, vilket möjliggör högspecifik och stabil visualisering. I U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-celler uppvisar märkt TPR en karakteristisk punktformig ringliknande distribution vid kärnmembranet, motsvarande NPC-associerade kärnkorgenstrukturer. Detta system är väl lämpat för kvantitativ fluorescensmikroskopi, superupplösningsavbildning, puls-chase-märkning och dynamiska studier av kärnkorgenmontering och omsättning. Den plana morfologin och de stora kärnorna i U2OS-celler underlättar högupplöst avbildning av kärnmembranassocierade strukturer.

TPR spelar en avgörande roll i mRNA-export, reglering av kärntransport, kromatinorganisation vid kärnans periferi och rumslig genomorganisation. TPR är också inblandat i bildandet av kärntransportrelaterade underkompartiment och i uteslutningen av heterokromatin från kärnporassocierade regioner. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP tillhandahåller en fysiologiskt relevant modell för att analysera kärnkorgenens arkitektur och dynamik, undersöka mekanismerna för transport mellan kärnan och cytoplasman samt studera interaktioner mellan kromatin och kärnmembranet under endogena expressionsförhållanden.

Organism Människan**Tissue** Ben**Disease** Osteosarkom**Egenskaper****Age** 15 år**Gender** Kvinna**Ethnicity** Kaukasisk**Morphology** Epitelliknande**Growth properties** Följsam**Lagstadgade uppgifter**

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-celler | 300667

Citation	U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (Cytion katalognummer 300667)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
Depositor	Ellenberg-laboratoriet (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Denna mänskliga osteosarkomcellinje (U2OS-CRISPR-TPR-SNAP) innehåller en CRISPR-konstruerad TPR-SNAP-fusion som möjliggör fluorescerande och kemisk märkning av TPR-kärnkorgsprotein. Konstruktionen är stabilt integrerad. Denna klassificering gäller endast inom Tyskland och kan skilja sig åt på andra håll.

Biomolekylära data

Protein expression	TPR, SNAP-tag
---------------------------	---------------

Hantering

Culture Medium	McCoy's 5a, w: 3,0 g/L Glukos, w: stabil Glutamin, w: 2,0 mM Natriumpyruvat, w: 2,2 g/L NaHCO ₃ (Cytion artikelnummer 820200a)
Supplements	Komplettera med 10% FBS, 3,0 g/L glukos, stabil glutamin, 2,0 mM natriumpyruvat, 2,2 g/L NaHCO ₃ , 1% NEAA
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Ta bort det gamla mediet från de adherenta cellerna och tvätta dem med PBS som saknar kalcium och magnesium. Använd 3-5 ml PBS för T25-kolvar och 5-10 ml för T75-kolvar. Täck sedan cellerna helt med Accutase, använd 1-2 ml för T25-kolvar och 2,5 ml för T75-kolvar. Låt cellerna inkubera i rumstemperatur i 8-10 minuter så att de lossnar. Efter inkubationen, blanda cellerna försiktigt med 10 ml medium för att resuspendera dem och centrifugera sedan vid 300xg i 3 minuter. Kassera supernatanten, resuspendera cellerna i färskt medium och överför dem till nya kolvar som redan innehåller färskt medium.
Freeze medium	Som kryokonservationsmedium använder vi komplett tillväxtmedium (inklusive FBS) + 10% DMSO för adekvat viabilitet efter upptining, eller CM-1 (Cytion katalognummer 800100), som innehåller optimerade osmoprotektanter och metaboliska stabilisatorer för att förbättra återhämtningen och minska kryoinducerad stress.

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-celler | 300667

Thawing and Culturing Cells

1. Bekräfta att flaskan är djupfryst vid leverans, eftersom cellerna skickas på torris för att bibehålla optimala temperaturer under transporten.
2. Vid mottagandet ska du antingen förvara kryovialen omedelbart vid temperaturer under $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ för att säkerställa att cellernas integritet bevaras, eller gå vidare till steg 3 om omedelbar odling krävs.
3. Vid omedelbar odling ska injektionsflaskan snabbt tinas genom att den sänks ned i ett $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vattenbad med rent vatten och ett antimikrobiellt medel och omrörs försiktigt i 40-60 sekunder tills en liten isklump återstår.
4. Utför alla efterföljande steg under sterila förhållanden i en flödeshuv och desinficera kryovialerna med 70 % etanol innan de öppnas.
5. Öppna försiktigt den desinficerade flaskan och överför cellsuspensionen till ett 15 ml centrifugrör som innehåller 8 ml rumstempererat odlingsmedium och blanda försiktigt.
6. Centrifugera blandningen vid $300 \times g$ i 3 minuter för att separera cellerna och kassera försiktigt supernatanten som innehåller resterande frysmedium.
7. Resuspendera försiktigt cellpelleten i 10 ml färskt odlingsmedium. För adherenta celler, fördela suspensionen mellan två T25-kulturkolv; för suspensionskulturer, överför allt medium till en T25-kolv för att främja effektiv cellinteraktion och tillväxt.
8. Följ fastställda subkulturprotokoll för fortsatt tillväxt och underhåll av cellinjen, vilket säkerställer tillförlitliga experimentella resultat.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , befuktad atmosfär.

Flask Coating

Ingen

Freezing Procedure

Kryopreserverade cellinjer skickas på torris i validerade, isolerade förpackningar med tillräckligt med kylmedel för att hålla cirka $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hela transporten. Vid mottagandet ska behållaren omedelbart inspekteras och flaskorna utan dröjsmål överföras till lämplig förvaring.

Shipping Conditions

Kryopreserverade cellinjer skickas på torris i validerade, isolerade förpackningar med tillräckligt med kylmedel för att hålla cirka $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hela transporten. Vid mottagandet ska behållaren omedelbart inspekteras och flaskorna utan dröjsmål överföras till lämplig förvaring.

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP-celler | 300667

Storage Conditions

För långtidsförvaring, placera flaskorna i flytande kväve i ångfas vid ca -150 till -196 °C. Förvaring vid -80 °C är acceptabelt endast som ett kort mellanliggande steg innan överföring till flytande kväve.

Kvalitetskontroll / Genetisk profil / HLA

Sterility

Mykoplasmakontaminering utesluts med hjälp av både PCR-baserade analyser och luminiscensbaserade metoder för mykoplasmadiagnostik.

För att säkerställa att det inte finns någon kontaminering av bakterier, svamp eller jäst utsätts cellkulturerna för dagliga visuella inspektioner.