

Bunky U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667**Všeobecné informácie****Description**

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP je genómovo upravená ľudská osteosarkómová bunková línia odvodená z buniek U2OS, v ktorej bol endogénny gén TPR (Translocated Promoter Region) modifikovaný pomocou technológie CRISPR/Cas9 tak, aby kódoval in-frame SNAP tag. TPR je veľký nukleoporín s vinutou špirálou, ktorý sa lokalizuje do jadrového koša na nukleoplazmatickej strane komplexu jadrových pórov (NPC). Označením TPR na jeho endogénnom mieste sa fúzny proteín exprimuje pod pôvodnou regulačnou kontrolou, čím sa zachovávajú fyziologické hladiny expresie a udržiava sa správne začlenenie do štruktúry jadrového koša.

SNAP tag umožňuje kovalentné značenie TPR fluorescenčnými substrátmi konjugovanými s benzylguanínom v živých alebo fixovaných bunkách, čo umožňuje vysoko špecifickú a stabilnú vizualizáciu. V bunkách U2OS-CRISPR-TPR-SNAP vykazuje značený TPR charakteristickú bodkovitú prstencovú distribúciu na jadrovej membráne, čo zodpovedá štruktúram jadrového koša asociovaných s NPC. Tento systém je vhodný na kvantitatívnu fluorescenčnú mikroskopiu, zobrazovanie s vysokým rozlíšením, pulzno-chase značenie a dynamické štúdie zostavovania a obratu jadrového koša. Plochá morfológia a veľké jadrá buniek U2OS uľahčujú zobrazovanie štruktúr asociovaných s jadrovou membránou s vysokým rozlíšením.

TPR hrá kľúčovú úlohu v exporte mRNA, regulácii jadrového transportu, organizácii chromatinu na okraji jadra a priestorovej organizácii genómu. TPR sa tiež podieľa na tvorbe subkompartmentov súvisiacich s jadrovým transportom a na vylúčení heterochromatinu z oblastí spojených s jadrovými pórmí. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP poskytuje fyziologicky relevantný model na rozbor architektúry a dynamiky jadrového koša, skúmanie mechanizmov nukleocytoplazmatického transportu a štúdiom interakcií chromatinu spojených s jadrovou obálkou za endogénnych expresných podmienok.

Organism	Ľudské
Tissue	Kosti
Disease	Osteosarkóm

Charakteristika

Age	15 rokov
Gender	Ženy
Ethnicity	Kaukazský
Morphology	Epitelu podobné
Growth properties	Adherent

Regulačné údaje

Bunky U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Citation	U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (katalógové číslo Cytion 300667)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
Depositor	Ellenbergova laboratória (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Táto línia ľudských osteosarkómových buniek (U2OS-CRISPR-TPR-SNAP) obsahuje fúziu TPR-SNAP vytvorenú pomocou CRISPR, ktorá umožňuje fluorescenčné a chemické značenie proteínu jadrového koša TPR. Konštrukt je stabilne integrovaný. Táto klasifikácia platí len v Nemecku a môže sa líšiť v iných krajinách.

Biomolekulárne údaje

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

Spracovanie

Culture Medium	McCoy's 5a, w: 3,0 g/l glukóza, w: stabilný glutamín, w: 2,0 mM pyruvát sodný, w: 2,2 g/l NaHCO ₃ (číslo článku Cytion 820200a)
Supplements	Doplňte médium o 10 % FBS, 3,0 g/l glukózy, stabilný glutamín, 2,0 mM pyruvát sodný, 2,2 g/l NaHCO ₃ , 1 % NEAA
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Odstráňte staré médium z adherovaných buniek a premyte ich PBS, ktorý neobsahuje vápnik a horčík. Pre banky T25 použite 3 - 5 ml PBS a pre banky T75 použite 5 - 10 ml. Potom bunky úplne pokryte Accutase, pričom použite 1 - 2 ml pre banky T25 a 2,5 ml pre banky T75. Nechajte bunky inkubovať pri izbovej teplote 8-10 minút, aby sa oddelili. Po inkubácii jemne premiešajte bunky s 10 ml média, aby boli znovu suspendované, a potom ich 3 minúty odstredíte pri 300xg. Supernatant zlikvidujte, bunky znovu rozmiešajte v čerstvom médiu a preneste ich do nových fliaš, ktoré už obsahujú čerstvé médium.
Freeze medium	Ako kryokonzervačné médium používame kompletne rastové médium (vrátane FBS) + 10 % DMSO na zabezpečenie primeranej životaschopnosti po rozmrazení alebo CM-1 (katalógové číslo 800100 spoločnosti Cytion), ktoré obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory na zlepšenie regenerácie a zníženie stresu spôsobeného kryom.

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

1. Overte si, že injekčná liekovka zostane pri doručení hlboko zmrazená, pretože bunky sa prepravujú na suchom ľade, aby sa počas prepravy udržala optimálna teplota.
2. Po prijatí buď okamžite uskladnite kryovialku pri teplote nižšej ako -150 °C, aby ste zabezpečili zachovanie bunkovej integrity, alebo prejdite na krok 3, ak je potrebná okamžitá kultivácia.
3. V prípade okamžitej kultivácie injekčnú liekovku rýchlo rozmrazte ponorením do vodného kúpeľa s teplotou 37 °C s čistou vodou a antimikrobiálnym prostriedkom, pričom ju jemne miešajte 40 - 60 sekúnd, kým nezostane malý ľadový chumáč.
4. Všetky ďalšie kroky vykonajte v sterilných podmienkach v prietokovom digestore a pred otvorením kryovialku dezinfikujte 70 % etanolom.
5. Opatrne otvorte dezinfikovanú fľaštičku a preneste bunkovú suspenziu do 15 ml centrifugačnej skúmavky obsahujúcej 8 ml kultivačného média s izbovou teplotou a jemne premiešajte.
6. Zmes odstreďujte pri 300 x g počas 3 minút, aby sa bunky oddelili, a opatrne zlikvidujte supernatant obsahujúci zvyšky zmrazovacieho média.
7. Pelet buniek jemne resuspendujte v 10 ml čerstvého kultivačného média. V prípade adherentných buniek rozdeľte suspenziu medzi dve kultivačné banky T25; v prípade suspenzných kultúr preneste všetko médium do jednej banky T25, aby ste podporili účinnú interakciu a rast buniek.
8. Dodržiavajte zavedené subkultivačné protokoly na nepretržitý rast a udržiavanie bunkovej línie, čím sa zabezpečia spoľahlivé výsledky experimentov.

**Incubation
Atmosphere**

37 °C, 5 % CO_2 , zvlhčená atmosféra.

Flask Coating

Žiadne

**Freezing
Procedure**

Kryokonzervované bunkové línie sa prepravujú na suchom ľade v overených, izolovaných obaloch s dostatočným množstvom chladiva na udržanie teploty približne -78 °C počas celej prepravy. Po prijatí ihneď skontrolujte obal a bezodkladne premiestnite injekčné liekovky do vhodného skladu.

**Shipping
Conditions**

Kryokonzervované bunkové línie sa prepravujú na suchom ľade v overených, izolovaných obaloch s dostatočným množstvom chladiva na udržanie teploty približne -78 °C počas celej prepravy. Po prijatí ihneď skontrolujte obal a bezodkladne premiestnite injekčné liekovky do vhodného skladu.

Bunky U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Storage Conditions

Na dlhodobé uchovávanie umiestnite injekčné liekovky do kvapalnej fázy dusíka v pare pri teplote približne -150 až -196 °C. Skladovanie pri teplote -80 °C je prijateľné len ako krátky prechodný krok pred presunom do tekutého dusíka.

Kontrola kvality / Genetický profil / HLA

Sterility

Kontaminácia mykoplazmami sa vylučuje pomocou testov založených na PCR a metód detekcie mykoplazmiem založených na luminiscencii.

Aby sa zabezpečilo, že nedošlo ku kontaminácii baktériami, hubami alebo kvasinkami, bunkové kultúry sa denne vizuálne kontrolujú.