

Celice U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667**Splošne informacije****Description**

U2OS-CRISPR-TPR-SNAP je genomsko spremenjena človeška osteosarkomna celična linija, pridobljena iz celic U2OS, v kateri je bil endogeni gen TPR (Translocated Promoter Region) spremenjen s tehnologijo CRISPR/Cas9, da kodira SNAP-oznako v okviru. TPR je velik nukleoporin v obliki navite spirale, ki se nahaja v jedrski košarici na nukleoplazemski strani jedrskega por kompleksa (NPC). Z označevanjem TPR na njegovem endogenem lokusu se fuzijski protein izraža pod naravnim regulativnim nadzorom, ohranja fiziološke ravni izražanja in vzdržuje ustrezno vključevanje v strukturo jedrske košarice.

Oznaka SNAP omogoča kovalentno označevanje TPR z benzilguaninom konjugiranimi fluorescenčnimi substrati v živih ali fiksiranih celicah, kar omogoča visoko specifično in stabilno vizualizacijo. V celicah U2OS-CRISPR-TPR-SNAP označeni TPR kaže značilno pikasto obročasto porazdelitev na jedrski ovojnici, ki ustreza strukturam jedrskega košarice, povezanim z NPC. Ta sistem je primeren za kvantitativno fluorescenčno mikroskopijo, slikanje z visoko ločljivostjo, označevanje s pulzno-zasledovanjem in dinamične študije sestavljanja in obnove jedrske košarice. Ravna morfologija in velika jedra celic U2OS omogočajo slikanje struktur, povezanih z jedrsko ovojnico, z visoko ločljivostjo.

TPR ima ključno vlogo pri izvozu mRNA, regulaciji jedrskega transporta, organizaciji kromatina na jedrskem obrobju in prostorski organizaciji genoma. TPR je vpleten tudi v nastajanje podkompartmentov, povezanih z jedrskim transportom, in v izključevanje heterokromatina iz regij, povezanih z jedrskimi porami. U2OS-CRISPR-TPR-SNAP zagotavlja fiziološko relevanten model za razčlenitev arhitekture in dinamike jedrske košarice, preučevanje mehanizmov jedrsko-citoplazmatskega prometa in študij interakcij kromatina, povezanih z jedrsko ovojnico, v endogenih izraževalnih pogojih.

Organism

Človek

Tissue

Kosti

Disease

Osteosarkom

Metastatic site

Mesto primarnega tumorja (kost)

Applications

Biologija jedrskega košarice; izvoz mRNA, posredovan s TPR; regulacija jedrsko-citoplazmatskega transporta; organizacija kromatina na obrobju jedra; podkompartimenti jedrskega transporta; prostorska organizacija genoma; mikroskopija s superrazločljivostjo; označevanje s tehniko SNAP pulse-chase; izključitev heterokromatina iz območij, povezanih s porami

Značilnosti**Age**

15 let

Gender

Ženske

Ethnicity

Kavkaški

Celice U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667**Morphology** Epitelijam podobni**Cell type** Epitelijske celice (osteosarkom)**Growth properties** Pripadajoče**Regulativni podatki****Citation** U2OS-CRISPR-TPR-SNAP (kataloška številka Cytion 300667)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** Ni dodeljeno (derivat celic U2OS, spremenjen s tehnologijo CRISPR; izvorne celice U2OS CVCL_0042)**Depositor** Laboratorij Ellenberg (EMBL)**GMO Status** GSO-S1: Ta celična linija človeškega osteosarkoma (U2OS-CRISPR-TPR-SNAP) vsebuje sintezo TPR-SNAP, izdelano s tehnologijo CRISPR, ki omogoča fluorescenčno in kemično označevanje proteina jedrne košarice TPR. Konstrukt je stabilno integriran. Ta razvrstitev velja samo v Nemčiji in se lahko drugje razlikuje.**Biomolekularni podatki****Protein expression** TPR, oznaka SNAP**Ravnanje s spletno stranjo****Culture Medium** McCoy's 5a, w: 3,0 g/L glukoze, w: stabilen glutamin, w: 2,0 mM natrijevega piruvata, w: 2,2 g/L NaHCO₃ (številka izdelka Cytion 820200a)**Supplements** Gojišče dopolnite z 10 % FBS, 3,0 g/L glukoze, stabilnim glutaminom, 2,0 mM natrijevega piruvata, 2,2 g/L NaHCO₃, 1 % NEAA**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** približno 24 do 36 ur

Celice U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Subculturing Odstranite staro gojišče z adherentnih celic in jih sperite s PBS, ki ne vsebuje kalcija in magnezija. Za bučke T25 uporabite 3-5 ml PBS, za bučke T75 pa 5-10 ml. Nato celice popolnoma prekrijte z Accutase, pri čemer uporabite 1-2 ml za bučke T25 in 2,5 ml za bučke T75. Celice pustite inkubirati pri sobni temperaturi 8-10 minut, da se ločijo. Po inkubaciji celice nežno premešajte z 10 ml gojišča, da se ponovno suspendirajo, nato jih 3 minute centrifugirajte pri 300xg. Zavržite supernatant, ponovno suspendirajte celice v svežem gojišču in jih prenesite v nove bučke, ki že vsebujejo sveže gojišče.

Split ratio 1 do 3

Seeding density 1 do 3×10^4 celic/cm²

Fluid renewal 2 do 3-krat na teden

Freeze medium Kot gojišče za kriokonzervacijo uporabljamo popolno rastno gojišče (vključno s FBS) + 10 % DMSO za ustrezno vitalnost po odmrznitvi ali CM-1 (kataloška številka 800100 podjetja Cytion), ki vključuje optimizirane osmoprotektante in presnovne stabilizatorje za izboljšanje okrevanja in zmanjšanje stresa, povzročene s kriom.

Celice U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Thawing and Culturing Cells

1. Prepričajte se, da je viala ob dostavi globoko zamrznjena, saj se celice pošiljajo na suhem ledu, da se med prevozom ohranijo optimalne temperature.
2. Po prejemu krioviala takoj shranite pri temperaturi pod $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, da zagotovite ohranitev celične celovitosti, ali pa nadaljujte s korakom 3, če je potrebno takojšnje gojenje.
3. Za takojšnje gojenje vialo hitro odtalite tako, da jo potopite v vodno kopel s čisto vodo in protimikrobnim sredstvom pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter 40-60 sekund nežno mešate, dokler ne ostane majhen ledeni kepica.
4. Vse nadaljnje korake izvajajte v sterilnih pogojih v pretočni nape, pred odprtjem pa krioviala razkužite s 70 % etanolom.
5. Previdno odprite razkuženo vialo in celično suspenzijo prenesite v 15-mililitrsko centrifugirno epruveto, ki vsebuje 8 ml gojišča sobne temperature, ter nežno premešajte.
6. Mešanico centrifugirajte pri $300 \times g$ 3 minute, da ločite celice, in previdno zavržite supernatant, ki vsebuje ostanke zamrzovalnega gojišča.
7. Pelet celic nežno ponovno suspendirajte v 10 ml svežega gojišča. Pri adherentnih celicah suspenzijo razdelite med dve bučki T25; pri suspenzijskih kulturah prenesite vse gojišče v eno bučko T25, da spodbudite učinkovito interakcijo in rast celic.
8. Upoštevajte uveljavljene protokole subkultur za nadaljnjo rast in vzdrževanje celične linije ter tako zagotovite zanesljive rezultate poskusov.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , vlažno ozračje.

Flask Coating

Nič

Freezing Procedure

Kriokonzervirane celične linije se pošiljajo na suhem ledu v potrjeni, izolirani embalaži z zadostno količino hladilnega sredstva, da se med prevozom vzdržuje približno $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ob prejemu takoj preglejte embalažo in vialo nemudoma prenesite v ustrezno skladišče.

Shipping Conditions

Kriokonzervirane celične linije se pošiljajo na suhem ledu v potrjeni, izolirani embalaži z zadostno količino hladilnega sredstva, da se med prevozom vzdržuje približno $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ob prejemu takoj preglejte embalažo in vialo nemudoma prenesite v ustrezno skladišče.

Celice U2OS-CRISPR-TPR-SNAP | 300667

Storage Conditions

Za dolgotrajno shranjevanje vial postavite v tekoči dušik v parni fazi pri približno -150 do -196 °C. Shranjevanje pri -80 °C je sprejemljivo le kot kratek vmesni korak pred prenosom v tekoči dušik.

Nadzor kakovosti / Genetski profil / HLA

Sterility

Kontaminacija z mikoplazmo se izključi z uporabo testov na podlagi PCR in metod za odkrivanje mikoplazme na podlagi luminiscence.

Da se zagotovi, da ni kontaminacije z bakterijami, glivami ali kvasovkami, se celične kulture dnevno vizualno pregledujejo.