

**Buňky U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple | 300461****Obecné informace****Description**

U-2 OS-CRISPR-NUP96-mMaple je geneticky upravená buněčná linie osteosarkomu odvozená od lidské buněčné linie U-2 OS, která je známá svými robustními růstovými vlastnostmi a použitelností v různých biologických studiích. Tento konkrétní klon byl upraven pomocí technologie editace genů CRISPR/Cas9 tak, aby do genu NUP96 byl začleněn mMaple, fotokonvertibilní fluorescenční protein. Protein mMaple umožňuje pokročilé zobrazovací techniky, jako je zobrazování živých buněk a mikroskopie se superrozlišením, a poskytuje dynamický pohled na chování komplexu jaderných pórů (NPC) a mechanismy buněčného importu a exportu přes jaderný obal.

Gen NUP96, který kóduje klíčovou složku NPC, je nezbytný pro nukleocytoplazmatický transport. Změna NUP96 může ovlivnit nejen transportní mechanismy, ale také celkovou jadernou architekturu a funkci. Tato buněčná linie tak slouží jako vynikající model pro studium patologií souvisejících s NPC a úlohy jaderného transportu v buněčném metabolismu a signalizaci. Integrace mMaple do NUP96 umožňuje sledování a vizualizaci dynamiky NUP96 v reálném čase in vivo, což z ní činí nepostradatelný nástroj pro výzkumníky zaměřené na studium buněčného jádra a pro ty, kteří zkoumají důsledky dysfunkcí NPC u onemocnění, jako je rakovina a virové infekce.

Jako specializovaný nástroj podporuje U-2 OS-CRISPR-NUP96-mMaple klon č. 16 zobrazování s vysokým rozlišením a poskytuje podstatné údaje týkající se prostorové a časové distribuce složek NPC. Je zvláště cenný pro experimenty vyžadující podrobnou analýzu genové exprese, lokalizace proteinů a jaderného transportu za fyziologických a patologických podmínek, což usnadňuje hlubší pochopení buněčných procesů na molekulární úrovni.

<b>Organism</b>	Člověk
<b>Tissue</b>	Kost
<b>Disease</b>	Osteosarkom

**Charakteristika**

<b>Age</b>	15 let
<b>Gender</b>	Ženy
<b>Ethnicity</b>	Kavkazský
<b>Growth properties</b>	Adherentní

**Regulační údaje**

## Buňky U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple | 300461

<b>Citation</b>	U-2 OS-CRISPR-NUP96-mMaple (katalogové číslo Cytion 300461)
<b>Biosafety level</b>	1
<b>NCBI_TaxID</b>	9606
<b>CellosaurusAccession</b>	CVCL_B7FK
<b>Depositor</b>	Ellenbergova laboratoř (EMBL)
<b>GMO Status</b>	GMO-S1: Tato lidská buněčná linie osteosarkomu (U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple, klon 16) obsahuje fúzi NUP96-mMaple zprostředkovanou CRISPR, která umožňuje fotokonvertibilní značení struktur jaderných pórů. Konstrukt je stabilně přítomen. Tato klasifikace platí pouze v Německu a může se lišit v jiných zemích.

## Biomolekulární data

<b>Protein expression</b>	NUP96-mMaple (endogenní protein jaderného pórového komplexu 96, značený mMaple)
---------------------------	---

## Zpracování

<b>Culture Medium</b>	McCoys 5a, w: 3,0 g/l glukóza, w: stabilní glutamin, w: 2,0 mM pyruvát sodný, w: 2,2 g/l NaHCO <sub>3</sub> (číslo článku Cytion 820200a)
<b>Supplements</b>	Doplňte médium o 10% FBS, 1% NEAA
<b>Dissociation Reagent</b>	Accutase
<b>Subculturing</b>	Odstraňte staré médium z adheovaných buněk a promyjte je PBS bez vápníku a hořčičku. Pro baňky T25 použijte 3-5 ml PBS a pro baňky T75 5-10 ml. Poté buňky zcela zakryjte přípravkem Accutase, přičemž použijte 1-2 ml pro baňky T25 a 2,5 ml pro baňky T75. Nechte buňky inkubovat při pokojové teplotě po dobu 8-10 minut, aby se oddělily. Po inkubaci jemně promíchejte buňky s 10 ml média, aby byly znovu suspendovány, a poté je odstředte při 300xg po dobu 3 minut. Supernatant vyhodte, buňky znovu rozpustte v čerstvém médiu a přeneste je do nových baněk, které již obsahují čerstvé médium.
<b>Split ratio</b>	Doporučuje se poměr 1:3 až 1:6
<b>Seeding density</b>	1 x 10 <sup>4</sup> buněk/cm <sup>2</sup>
<b>Fluid renewal</b>	2 až 3krát týdně

**Buňky U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple | 300461****Freeze medium**

Jako kryokonzervační médium používáme kompletní růstové médium (včetně FBS) + 10 % DMSO pro zajištění dostatečné životaschopnosti po rozmrazení nebo CM-1 (katalogové číslo 800100 společnosti Cytion), které obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory pro zlepšení regenerace a snížení stresu způsobeného kryo.

**Thawing and Culturing Cells**

1. Ověřte si, že lahvička zůstane při dodání hluboce zmrazená, protože buňky se přepravují na suchém ledu, aby se během přepravy udržely optimální teploty.
2. Po obdržení kryovialku buď okamžitě uložte při teplotě nižší než -150 °C, abyste zajistili zachování buněčné integrity, nebo přejděte ke kroku 3, pokud je nutná okamžitá kultivace.
3. Pro okamžitou kultivaci rychle rozmrazte lahvičku ponořením do vodní lázně o teplotě 37 °C s čistou vodou a antimikrobiálním prostředkem a jemně ji míchejte po dobu 40-60 sekund, dokud nezůstane malý ledový chuchvalec.
4. Všechny další kroky provádějte za sterilních podmínek v průtokové digestoři a před otevřením kryovialku dezinfikujte 70% ethanolem.
5. Opatrně otevřete dezinfikovanou lahvičku a přeneste buněčnou suspenzi do 15 ml centrifugační zkumavky obsahující 8 ml kultivačního média o pokojové teplotě a jemně promíchejte.
6. Směs odstředíte při 300 x g po dobu 3 minut, aby se buňky oddělily, a supernatant obsahující zbytky mrazicího média opatrně zlikvidujte.
7. Pelety buněk jemně resuspendujte v 10 ml čerstvého kultivačního média. U adherentních buněk rozdělíte suspenzi mezi dvě kultivační baňky T25; u suspenzních kultur přeneste veškeré médium do jedné baňky T25, abyste podpořili účinnou interakci a růst buněk.
8. Dodržujte zavedené subkultivační protokoly pro kontinuální růst a udržování buněčné linie, čímž zajistíte spolehlivé výsledky experimentů.

**Incubation Atmosphere**

37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ , zvlhčená atmosféra.

**Flask Coating**

Žádný

**Freezing Procedure**

Kryokonzervované buněčné linie se přepravují na suchém ledu v ověřených, izolovaných obalech s dostatečným množstvím chladiva, aby se po celou dobu přepravy udržovala teplota přibližně -78 °C. Po obdržení ihned zkontrolujte obal a neprodleně přeneste lahvičky do vhodného skladu.

## Buňky U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple | 300461

### Shipping Conditions

Kryokonzervované buněčné linie se přepravují na suchém ledu v ověřených, izolovaných obalech s dostatečným množstvím chladiva, aby se po celou dobu přepravy udržovala teplota přibližně -78 °C. Po obdržení ihned zkontrolujte obal a neprodleně přeneste lahvičky do vhodného skladu.

### Storage Conditions

Pro dlouhodobé uchování umístěte lahvičky do kapalného dusíku v plynné fázi při teplotě přibližně -150 až -196 °C. Skladování při -80 °C je přijatelné pouze jako krátký přechodný krok před přemístěním do kapalného dusíku.

## Kontrola kvality / Genetický profil / HLA

### Sterility

Kontaminace mykoplazmaty je vyloučena jak pomocí testů založených na PCR, tak pomocí luminiscenčních metod detekce mykoplazmy.

Aby se zajistilo, že nedojde ke kontaminaci bakteriemi, plísněmi nebo kvasinkami, jsou buněčné kultury denně podrobovány vizuálním kontrolám.