

Buňky U2OS-CRISPR-NUP96-Halo | 300448**Obecné informace****Description**

U-2 OS-CRISPR-NUP96-Halo je geneticky upravená buněčná linie odvozená z buněk lidského osteosarkomu U-2 OS. Tato buněčná linie byla upravena pomocí technologie CRISPR-Cas9 tak, aby do lokusu genu NUP96 byla začleněna značka HaloTag. NUP96, součást komplexu jaderných pórů, hraje klíčovou roli v jaderném transportu a buněčné regulaci. Zavedení HaloTag umožňuje přesnou vizualizaci a biochemickou charakterizaci dynamiky a interakcí NUP96 v buňce.

Tím, že usnadňuje kovalentní připojení fluorescenčních ligandů nebo jiných sond, umožňuje HaloTag zobrazování v reálném čase a poskytuje výkonný nástroj pro studium mechanismů jaderného transportu v živých buňkách. Tento konkrétní klon s číslem 252 byl vybrán pro stabilní expresi NUP96 s označením HaloTag, což zajišťuje konzistentní výkon v experimentálních sestavách. Díky této vlastnosti je velmi vhodný pro zobrazovací techniky s vysokým rozlišením a studie molekulárních interakcí, čímž podporuje pokročilý výzkum v buněčné biologii, zejména v kontextu jaderné funkce a genetické regulace.

Organism Člověk**Tissue** Kost**Disease** Osteosarkom**Charakteristika****Age** 15 let**Gender** Ženy**Ethnicity** Kavkazský**Morphology** Epitelu podobné**Growth properties** Adherentní**Regulační údaje****Citation** U-2 OS-CRISPR-NUP96-Halo (katalogové číslo Cytion 300448)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606

Buňky U2OS-CRISPR-NUP96-Halo | 300448**CellosaurusAccession** CVCL_B7FI**Depositor** Ellenbergova laboratoř (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Tato lidská buněčná linie osteosarkomu (U2OS-CRISPR-NUP96-Halo, klon 252) obsahuje CRISPR-editovanou fúzi NUP96-Halo vytvořenou pomocí lentivirového přenosu, která umožňuje fluorescenční značení komplexů jaderných pórů. Modifikace je stabilně integrovaná. Tato klasifikace platí pouze v Německu a jinde se může lišit.**Biomolekulární data****Protein expression** NUP96-Halo (endogenní protein jaderného pórového komplexu 96, značený Halo)**Zpracování****Culture Medium** McCoys 5a, w: 3,0 g/l glukóza, w: stabilní glutamin, w: 2,0 mM pyruvát sodný, w: 2,2 g/l NaHCO₃ (číslo článku Cytion 820200a)**Supplements** Doplněte médium o 10% FBS**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Odstraňte staré médium z adherovaných buněk a promyjte je PBS bez vápníku a hořčíku. 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 odstředěte při 300xg po dobu 3 minut. Supernatant vyhodte, buňky znovu rozpusťte v čerstvém médiu a přeneste je do nových baněk, které již obsahují čerstvé médium.**Split ratio** Doporučuje se poměr 1:3 až 1:4**Seeding density** 1×10^4 buněk/cm²**Fluid renewal** 2 až 3krát týdně**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.

Buňky U2OS-CRISPR-NUP96-Halo | 300448**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 odstřeďte 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 rozdělte 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 % 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.

**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.

Buňky U2OS-CRISPR-NUP96-Halo | 300448**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.

Profil STR

CSF1PO: 13,14

D13S317: 13,13

D16S539: 9,11

D5S818: 11,12

D7S820: 11,12

TH01: 9,3,9,3

TPOX: 11,12

vWA: 14,18

D3S1358: 16,16

D21S11: 31,32

D18S51: 12,14

Penta E: 10,13

Penta D: 9,9

D8S1179: 12,14

FGA: 20,20

Alely HLA

A*: '02:01:01, '32:01:01

B*: '44:02:01, '44:27:01

C*: '05:01:01, '07:04:01

DRB1*: '09:01:02G, '14:54:01

DQA1*: '01:04:01, '03:02:01

DQB1*: '03:03:02, '05:03:01

DPB1*: '02:01:02, '04:01:01

E: '01:01:01