

**Buňky U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP | 300174****Obecné informace****Description**

U-2 OS-CRISPR-NUP96-mEGFP je geneticky modifikovaná buněčná linie odvozená od mateřské linie lidského osteosarkomu U-2 OS. Tato buněčná linie obsahuje cílenou inzerci monomerního zesíleného zeleného fluorescenčního proteinu (mEGFP) do lokusu genu NUP96, které bylo dosaženo pomocí technologie editace genů CRISPR-Cas9. NUP96, součást komplexu jaderných pórů, je nezbytný pro jaderný transport a jeho fúze s mEGFP umožňuje vizualizaci dynamiky jaderných pórů v reálném čase pod fluorescenčním mikroskopem, což poskytuje cenné poznatky o mechanismech jaderného transportu a nukleocytoplazmatické dopravy.

Tento specifický klon s číslem 195 byl vybrán pro stabilní expresi fúzního proteinu NUP96-mEGFP a zachovává si typické vlastnosti linie U-2 OS, včetně robustní cytoskeletální struktury, která je rozhodující pro studie týkající se migrace a metastazování nádorových buněk. Použití technologie CRISPR zajišťuje přesnou editaci genů a minimalizuje necílové účinky, které by mohly ohrozit integritu výsledků experimentu. Díky tomu je klon U-2 OS-CRISPR-NUP96-mEGFP č. 195 obzvláště užitečný pro zobrazovací techniky s vysokým rozlišením a podrobné studie buněčné architektury, což napomáhá pokročilému výzkumu v oblasti buněčné biologie, výzkumu rakoviny a jaderných transportních jevů.

**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-mEGFP klon č. 195 (katalogové číslo Cytion 300174)

**Biosafety level**

1

**Buňky U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP | 300174****NCBI\_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL\_B7FJ**Depositor** Ellenbergova laboratoř (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Tato lidská buněčná linie osteosarkomu (U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP, klon 195) obsahuje CRISPR-inženýrskou fúzi NUP96-mEGFP, která byla zavedena prostřednictvím lentivirového přenosu a umožňuje fluorescenční sledování komplexů jaderných pórů. Modifikace je stabilně integrovaná. Tato klasifikace platí pouze v Německu a jinde se může lišit.**Biomolekulární data****Protein expression** MEGFP (protein jaderného pórového komplexu 96, značený mEGFP)**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 NaHCO<sub>3</sub> (číslo článku Cytion 820200a)**Supplements** Doplněte médium o 10% FBS, 1% NEAA**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Odstraňte staré médium z adherovaných 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 rozpusťte v čerstvém médiu a přeneste je do nových baněk, které již obsahují čerstvé médium.**Split ratio** Doporučuje se poměr 1:2 každé 2 až 3 dny. Lze uchovávat do 1 dne po splynutí**Seeding density** 2 až 3 x 10<sup>4</sup> buněk/cm<sup>2</sup>**Fluid renewal** 2 až 3krát týdně

**Buňky U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP | 300174****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-mEGFP | 300174

### 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 vizuální kontrolám.

### Profil STR

**PEZ6:** CLS-354