

U2OS-CRISPR-NUP96-SNAP-celler | 300444**Generel information****Description**

U-2 OS-CRISPR-NUP96-SNAP er en genetisk modificeret osteosarkomcellelinje, der stammer fra den humane U-2 OS-cellelinje. Denne cellelinje er blevet konstrueret gennem CRISPR/Cas9-medieret genomredigering for at inkorporere et SNAP-tag ved NUP96-genet, hvilket muliggør visualisering og undersøgelse af nukleare porekomplekseres dynamik. Kerneporekomplekser (NPC'er) er afgørende for reguleringen af nukleocytoplasmatiske transport, og NUP96 er en væsentlig komponent i NPC'en, der spiller en central rolle i dens strukturelle integritet og funktion.

I U-2 OS-CRISPR-NUP96-SNAP klon nr. 33 giver integrationen af SNAP-tagget i NUP96 locus mulighed for specifik og kovalent fastgørelse af fluorescerende substrater eller andre kemiske prober, der kan bruges til live-celle billeddannelse og andre biokemiske analyser. Denne funktion gør den til et uvurderligt værktøj til at undersøge den molekylære dynamik i nukleocytoplasmatiske transport, forstå NPC-relaterede patologier og screene for terapeutiske forbindelser, der påvirker NPC-funktionen. Cellelinjen bevarer også egenskaberne ved forældrelinjen U-2 OS, som omfatter en høj grad af genetisk stabilitet og nem dyrkning, hvilket gør den velegnet til screening med høj kapacitet og udvidede undersøgelser inden for cellebiologi.

På grund af modificeringens specificitet ved NUP96-genet giver U-2 OS-CRISPR-NUP96-SNAP-klon nr. 33 en unik model til detaljeret undersøgelse af NPC-komponenter i forbindelse med cellulær funktion og dysfunktion. Forskere kan udnytte SNAP-tag-systemet til selektivt og hurtigt at mærke NUP96, hvilket muliggør realtidsvisualisering af NPC-dynamik under fysiologiske og patologiske forhold. Denne specifikke klon kan fungere som en robust platform for både grundforskning og anvendte biomedicinske undersøgelser og bidrage væsentligt til områderne cellebiologi, genetik og onkologi.

Organism Menneske**Tissue** Knogle**Disease** Osteosarkom**Karakteristika****Age** 15 år**Gender** Kvinde**Ethnicity** Kaukasisk**Growth properties** Vedhæftende**Regulatoriske data**

U2OS-CRISPR-NUP96-SNAP-celler | 300444

Citation	U-2 OS-CRISPR-NUP96-SNAP (Cytion katalognummer 300444)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_B7FL
Depositor	Ellenberg-laboratoriet (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Denne humane osteosarkomcellelinje (U2OS-CRISPR-NUP96-SNAP, klon 33) indeholder en CRISPR-konstrueret NUP96-SNAP-fusion, der muliggør kemisk mærkning af kerneporer med SNAP-tag. Modifikationen er stabilt integreret. Denne klassifikation gælder kun i Tyskland og kan variere andre steder.

Biomolekylære data

Protein expression	NUP96-SNAP (nukleart porekompleks protein 96, SNAP-tag)
---------------------------	---

Håndtering

Culture Medium	McCoys 5a, w: 3,0 g/L Glukose, w: stabil Glutamin, w: 2,0 mM Natriumpyruvat, w: 2,2 g/L NaHCO ₃ (Cytion artikelnummer 820200a)
Supplements	Suppler mediet med 10 % FBS, 3,0 g/L glukose, stabil glutamin, 2,0 mM natriumpyruvat, 2,2 g/L NaHCO ₃ , 1 % NEAA
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Fjern det gamle medium fra de klæbende celler, og vask dem med PBS, der ikke indeholder calcium og magnesium. Brug 3-5 ml PBS til T25-kolber og 5-10 ml til T75-kolber. Dæk derefter cellerne helt med Accutase, brug 1-2 ml til T25-kolber og 2,5 ml til T75-kolber. Lad cellerne inkubere ved stuetemperatur i 8-10 minutter for at løsne dem. Efter inkubationen blandes cellerne forsigtigt med 10 ml medium for at resuspendere dem, og centrifugeres derefter ved 300xg i 3 minutter. Kassér supernatanten, resuspend cellerne i frisk medium, og overfør dem til nye kolber, der allerede indeholder frisk medium.
Seeding density	1 x 10 ⁴ celler/cm ²
Fluid renewal	2 til 3 gange om ugen

U2OS-CRISPR-NUP96-SNAP-celler | 300444**Freeze medium**

Som kryopræserveringsmedium bruger vi komplet vækstmedium (inklusive FBS) + 10 % DMSO for tilstrækkelig levedygtighed efter optøning eller CM-1 (Cytion-katalognummer 800100), som indeholder optimerede osmobybeskyttende stoffer og metaboliske stabilisatorer for at forbedre genopretningen og reducere kryo-induceret stress.

Thawing and Culturing Cells

1. Bekræft, at hætteglasset forbliver dybfrosset ved levering, da cellerne sendes på tøris for at opretholde optimale temperaturer under transport.
2. Ved modtagelsen skal du enten straks opbevare kryohætteglasset ved temperaturer under $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ for at sikre, at cellernes integritet bevares, eller gå videre til trin 3, hvis øjeblikkelig dyrkning er påkrævet.
3. Ved øjeblikkelig dyrkning optøs hætteglasset hurtigt ved at nedsænke det i et $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ varmt vandbad med rent vand og et antimikrobielt middel og røre forsigtigt i 40-60 sekunder, indtil der kun er en lille isklump tilbage.
4. Udfør alle efterfølgende trin under sterile forhold i en flowhætte, og desinficer kryovialet med 70 % ethanol, før det åbnes.
5. Åbn forsigtigt det desinficerede hætteglas, og overfør cellesuspensionen til et 15 ml centrifugerør, der indeholder 8 ml kulturmedium ved stuetemperatur, og bland forsigtigt.
6. Centrifuger blandingen ved $300 \times g$ i 3 minutter for at adskille cellerne, og kassér omhyggeligt supernatanten, der indeholder resterende frysemedium.
7. Resuspender forsigtigt cellepelleten i 10 ml frisk dyrkningsmedium. For klæbende celler deles suspensionen mellem to T25-kulturkolber; for suspensionskulturer overføres alt mediet til en T25-kolbe for at fremme effektiv celleinteraktion og -vækst.
8. Overhold etablerede subkulturprotokoller for fortsat vækst og vedligeholdelse af cellelinjen, hvilket sikrer pålidelige eksperimentelle resultater.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , befugtet atmosfære.

Flask Coating

Ingen

Freezing Procedure

Kryopræservede cellelinjer sendes på tøris i valideret, isoleret emballage med tilstrækkeligt kølemiddel til at opretholde ca. $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hele transporten. Ved modtagelse skal beholderen straks inspiceres, og hætteglassene skal straks overføres til passende opbevaring.

U2OS-CRISPR-NUP96-SNAP-celler | 300444

Shipping Conditions

Kryopræservede cellelinjer sendes på tøris i valideret, isoleret emballage med tilstrækkeligt kølemiddel til at opretholde ca. -78 °C under hele transporten. Ved modtagelse skal beholderen straks inspiceres, og hætteglassene skal straks overføres til passende opbevaring.

Storage Conditions

For langtidsopbevaring anbringes hætteglas i flydende nitrogen i dampfase ved ca. -150 til -196 °C. Opbevaring ved -80 °C er kun acceptabelt som et kort mellemtrin før overførsel til flydende nitrogen.

Kvalitetskontrol / Genetisk profil / HLA

Sterility

Mycoplasma-kontaminering udelukkes ved hjælp af både PCR-baserede assays og luminescensbaserede mycoplasma-detektionsmetoder.

For at sikre, at der ikke er nogen bakterie-, svampe- eller gærforurening, underkastes cellekulturerne daglige visuelle inspektioner.