

## Κύτταρα U2OS-CRISPR-NUP96-Halo | 300448

## Γενικές πληροφορίες

## Description

Το U-2 OS-CRISPR-NUP96-Halo είναι μια γενετικά τροποποιημένη κυτταρική σειρά που προέρχεται από τα κύτταρα U-2 OS του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος. Αυτή η κυτταρική σειρά έχει τροποποιηθεί με τη χρήση της τεχνολογίας CRISPR-Cas9 για την ενσωμάτωση μιας ετικέτας HaloTag στον τόπο του γονιδίου NUP96. Το NUP96, μέρος του συμπλόκου των πυρηνικών πόρων, διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην πυρηνική μεταφορά και την κυτταρική ρύθμιση. Η εισαγωγή του HaloTag επιτρέπει την ακριβή απεικόνιση και τον βιοχημικό χαρακτηρισμό της δυναμικής και των αλληλεπιδράσεων του NUP96 εντός του κυττάρου.

Διευκολύνοντας την ομοιοπολική προσκόλληση φθορίζοντων συνδέσμων ή άλλων ανιχνευτών, το HaloTag επιτρέπει την απεικόνιση σε πραγματικό χρόνο και παρέχει ένα ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη των μηχανισμών πυρηνικής μεταφοράς σε ζωντανά κύτταρα. Ο συγκεκριμένος κλώνος, με αριθμό 252, έχει επιλεγεί για τη σταθερή έκφραση του HaloTagged NUP96, εξασφαλίζοντας σταθερή απόδοση σε πειραματικές διατάξεις. Το χαρακτηριστικό αυτό τον καθιστά ιδιαίτερα κατάλληλο για τεχνικές απεικόνισης υψηλής ανάλυσης και μελέτες μοριακής αλληλεπίδρασης, υποστηρίζοντας έτσι την προηγμένη έρευνα στην κυτταρική βιολογία, ιδίως στο πλαίσιο της πυρηνικής λειτουργίας και της γενετικής ρύθμισης.

## Organism

Ανθρώπινο

## Tissue

Οστά

## Disease

Οστεοσάρκωμα

## Χαρακτηριστικά

## Age

15 χρόνια

## Gender

Γυναίκα

## Ethnicity

Καυκάσιος

## Morphology

Επιθηλιοειδής

## Growth properties

Προσκολλημένο

## Ρυθμιστικά δεδομένα

## Citation

U-2 OS-CRISPR-NUP96-Halo (αριθμός καταλόγου Cytion 300448)

## Biosafety level

1

**Κύτταρα U2OS-CRISPR-NUP96-Halo | 300448****NCBI\_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL\_B7FI**Depositor** Εργαστήριο Ellenberg (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Αυτή η ανθρώπινη κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος (U2OS-CRISPR-NUP96-Halo, κλώνος 252) περιέχει μια τροποποιημένη με CRISPR σύντηξη NUP96-Halo, η οποία παράγεται μέσω λεντιϊκής μεταφοράς, επιτρέποντας τη φθορίζουσα σήμανση των συμπλόκων των πυρηνικών πόρων. Η τροποποίηση είναι σταθερά ενσωματωμένη. Η ταξινόμηση αυτή ισχύει μόνο εντός της Γερμανίας και ενδέχεται να διαφέρει αλλού.**Βιομοριακά δεδομένα****Protein expression** NUP96-Halo (ενδογενής πρωτεΐνη 96 του συμπλέγματος πυρηνικών πόρων, με ετικέτα Halo)**Χειρισμός****Culture Medium** McCoys 5a, w: 3,0 g/L γλυκόζη, w: σταθερή γλουταμίνη, w: 2,0 mM πυρροβικό νάτριο, w: 2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub> (αριθμός άρθρου Cytion 820200a)**Supplements** Συμπληρώστε το μέσο με 10% FBS**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Αφαιρέστε το παλιό μέσο από τα προσκολλημένα κύτταρα και πλύντε τα με PBS που δεν περιέχει ασβέστιο και μαγνήσιο. Για φιάλες T25, χρησιμοποιήστε 3-5 ml PBS και για φιάλες T75, χρησιμοποιήστε 5-10 ml. Στη συνέχεια, καλύψτε πλήρως τα κύτταρα με Accutase, χρησιμοποιώντας 1-2 ml για φιάλες T25 και 2,5 ml για φιάλες T75. Αφήστε τα κύτταρα να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου για 8-10 λεπτά για να αποκολληθούν. Μετά την επώαση, αναμειξτε απαλά τα κύτταρα με 10 ml μέσου για να ανασυσταθούν και, στη συνέχεια, φυγοκεντρίστε στα 300xg για 3 λεπτά. Απορρίψτε το υπερκείμενο υγρό, ανασυστάστε τα κύτταρα σε φρέσκο μέσο και μεταφέρετέ τα σε νέες φιάλες που περιέχουν ήδη φρέσκο μέσο.**Seeding density**  $1 \times 10^4$  κύτταρα/cm<sup>2</sup>**Fluid renewal** 2 έως 3 φορές την εβδομάδα**Freeze medium** Ως μέσο κρυοσυντήρησης, χρησιμοποιούμε πλήρες μέσο ανάπτυξης (συμπεριλαμβανομένου του FBS) + 10% DMSO για επαρκή βιωσιμότητα μετά την απόψυξη, ή CM-1 (αριθμός καταλόγου Cytion 800100), το οποίο περιλαμβάνει βελτιστοποιημένα ωσμοπροστατευτικά και μεταβολικούς σταθεροποιητές για την ενίσχυση της ανάκαμψης και τη μείωση του στρες που προκαλείται από την κρυοσυντήρηση.

**Κύτταρα U2OS-CRISPR-NUP96-Halo | 300448****Thawing and  
Culturing Cells**

1. Επιβεβαιώστε ότι το φιαλίδιο παραμένει βαθιά παγωμένο κατά την παράδοση, καθώς τα κύτταρα αποστέλλονται σε ξηρό πάγο για να διατηρούνται οι βέλτιστες θερμοκρασίες κατά τη μεταφορά.
2. Κατά την παραλαβή, είτε αποθηκεύστε το κρουφιαλίδιο αμέσως σε θερμοκρασίες κάτω των  $-150^{\circ}\text{C}$  για να διασφαλίσετε τη διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας, είτε προχωρήστε στο βήμα 3 εάν απαιτείται άμεση καλλιέργεια.
3. Για άμεση καλλιέργεια, αποψύξτε γρήγορα το φιαλίδιο βυθίζοντάς το σε υδατόλουτρο  $37^{\circ}\text{C}$  με καθαρό νερό και αντιμικροβιακό παράγοντα, αναδεύοντας απαλά για 40-60 δευτερόλεπτα μέχρι να παραμείνει ένα μικρό σβόλο πάγου.
4. Εκτελέστε όλα τα επόμενα βήματα υπό αποστειρωμένες συνθήκες σε απορροφητήρα ροής, απολυμαίνοντας το κρουφιαλίδιο με 70% αιθανόλη πριν από το άνοιγμα.
5. Ανοίξτε προσεκτικά το απολυμασμένο φιαλίδιο και μεταφέρετε το εναιώρημα των κυττάρων σε ένα σωληνάριο φυγοκέντρησης των 15 ml που περιέχει 8 ml θρεπτικού μέσου καλλιέργειας σε θερμοκρασία δωματίου, αναμειγνύοντας απαλά.
6. Φυγοκεντρίστε το μείγμα στα 300 x g για 3 λεπτά για να διαχωριστούν τα κύτταρα και απορρίψτε προσεκτικά το υπερκείμενο που περιέχει το υπόλοιπο μέσο κατάψυξης.
7. Επανασυσσωματώστε απαλά το κυτταρικό σφαιρίδιο σε 10 ml φρέσκου μέσου καλλιέργειας. Για προσκολλημένα κύτταρα, μοιράστε το εναιώρημα σε δύο φιάλες καλλιέργειας T25- για καλλιέργειες εναιωρήματος, μεταφέρετε όλο το μέσο σε μία φιάλη T25 για να προωθήσετε την αποτελεσματική αλληλεπίδραση και ανάπτυξη των κυττάρων.
8. Τηρείτε τα καθιερωμένα πρωτόκολλα υποκαλλιέργειας για τη συνεχή ανάπτυξη και διατήρηση της κυτταρικής σειράς, εξασφαλίζοντας αξιόπιστα πειραματικά αποτελέσματα.

**Incubation  
Atmosphere**

$37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , υγραποιημένη ατμόσφαιρα.

**Flask Coating**

Για βέλτιστη προσκόλληση και βιωσιμότητα μετά την απόψυξη, συνιστούμε τη χρήση **φιαλών ή πλακών με επικάλυψη κολλαγόνου**.

**Freezing  
Procedure**

Οι κρουσυντηρημένες κυτταρικές σειρές αποστέλλονται σε ξηρό πάγο σε επικυρωμένη, μονωμένη συσκευασία με επαρκές ψυκτικό μέσο για τη διατήρηση περίπου των  $-78^{\circ}\text{C}$  καθ' όλη τη διάρκεια της μεταφοράς. Κατά την παραλαβή, επιθεωρήστε αμέσως τον περιέκτη και μεταφέρετε τα φιαλίδια χωρίς καθυστέρηση στην κατάλληλη αποθήκη.

**Κύτταρα U2OS-CRISPR-NUP96-Halo | 300448****Shipping Conditions**

Οι κρυοσυντηρημένες κυτταρικές σειρές αποστέλλονται σε ξηρό πάγο σε επικυρωμένη, μονωμένη συσκευασία με επαρκές ψυκτικό μέσο για τη διατήρηση περίπου των -78 °C καθ' όλη τη διάρκεια της μεταφοράς. Κατά την παραλαβή, επιθεωρήστε αμέσως τον περιέκτη και μεταφέρετε τα φιαλίδια χωρίς καθυστέρηση στην κατάλληλη αποθήκη.

**Storage Conditions**

Για μακροχρόνια συντήρηση, τοποθετήστε τα φιαλίδια σε υγρό άζωτο σε φάση ατμών σε θερμοκρασία περίπου -150 έως -196 °C. Η αποθήκευση στους -80 °C είναι αποδεκτή μόνο ως σύντομο ενδιάμεσο βήμα πριν από τη μεταφορά σε υγρό άζωτο.

**Ποιοτικός έλεγχος / Γενετικό προφίλ / HLA****Sterility**

Η μόλυνση από μυκόπλασμα αποκλείεται με τη χρήση τόσο των δοκιμασιών που βασίζονται στην PCR όσο και των μεθόδων ανίχνευσης μυκοπλάσματος με βάση τη φωταύγεια.

Για να διασφαλιστεί ότι δεν υπάρχει μόλυνση από βακτήρια, μύκητες ή ζύμες, οι κυτταροκαλλιέργειες υποβάλλονται σε καθημερινές οπτικές επιθεωρήσεις.

**HLA αλληλόμορφα**

**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