

Cellules U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple | 300461**Informations générales****Description**

La lignée cellulaire U-2 OS-CRISPR-NUP96-mMaple est une lignée cellulaire d'ostéosarcome génétiquement modifiée, dérivée de la lignée cellulaire humaine U-2 OS, connue pour ses caractéristiques de croissance robustes et son utilité dans diverses études biologiques. Ce clone particulier a été modifié à l'aide de la technologie d'édition de gènes CRISPR/Cas9 pour incorporer mMaple, une protéine fluorescente photoconvertible, dans le gène NUP96. La protéine mMaple permet d'utiliser des techniques d'imagerie avancées telles que l'imagerie de cellules vivantes et la microscopie à super-résolution, ce qui donne un aperçu dynamique du comportement du complexe du pore nucléaire (CPN) et des mécanismes d'importation et d'exportation cellulaires à travers l'enveloppe nucléaire.

Le gène NUP96, qui code pour un composant crucial du NPC, est essentiel pour le transport nucléocytoplasmique. L'altération du gène NUP96 peut affecter non seulement les mécanismes de transport, mais aussi l'architecture et la fonction nucléaires dans leur ensemble. Cette lignée cellulaire constitue donc un excellent modèle pour l'étude des pathologies liées au NPC et du rôle du transport nucléaire dans le métabolisme et la signalisation cellulaires. L'intégration de mMaple dans NUP96 permet de suivre et de visualiser en temps réel la dynamique de NUP96 in vivo, ce qui en fait un outil indispensable pour les chercheurs qui se consacrent à l'étude des noyaux cellulaires et pour ceux qui explorent les implications des dysfonctionnements du NPC dans des maladies telles que le cancer et les infections virales.

En tant qu'outil spécialisé, le clone U-2 OS-CRISPR-NUP96-mMaple no.16 permet l'imagerie à haute résolution et fournit des données substantielles sur la distribution spatiale et temporelle des composants du NPC. Il est particulièrement utile pour les expériences nécessitant une analyse détaillée de l'expression des gènes, de la localisation des protéines et du transport nucléaire dans des conditions physiologiques et pathologiques, ce qui permet de mieux comprendre les processus cellulaires au niveau moléculaire.

Organism Humain**Tissue** Os**Disease** Ostéosarcome**Caractéristiques****Age** 15 ans**Gender** Femme**Ethnicity** Caucasien**Growth properties** Adhérent**Données réglementaires**

Cellules U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple | 300461

Citation	U-2 OS-CRISPR-NUP96-mMaple (numéro de catalogue Cytion 300461)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_B7FK
Depositor	Le laboratoire Ellenberg (EMBL)
GMO Status	OGM-S1 : Cette lignée cellulaire humaine d'ostéosarcome (U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple, clone 16) contient une fusion NUP96-mMaple médiée par CRISPR permettant le marquage photoconvertible des structures des pores nucléaires. La construction est présente de manière stable. Cette classification ne s'applique qu'à l'Allemagne et peut différer dans d'autres pays.

Données biomoléculaires

Protein expression	NUP96-mMaple (protéine 96 du complexe du pore nucléaire endogène, étiquetée mMaple)
---------------------------	---

Manipulation

Culture Medium	McCoy's 5a, w : 3.0 g/L Glucose, w : Glutamine stable, w : 2.0 mM Pyruvate de sodium, w : 2.2 g/L NaHCO ₃ (numéro d'article Cytion 820200a)
Supplements	Compléter le milieu avec 10 % de FBS, 1 % de NEAA
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Retirer l'ancien milieu des cellules adhérentes et les laver avec du PBS dépourvu de calcium et de magnésium. Pour les flacons T25, utiliser 3-5 ml de PBS, et pour les flacons T75, 5-10 ml. Ensuite, recouvrir complètement les cellules avec Accutase, en utilisant 1 à 2 ml pour les flacons T25 et 2,5 ml pour les flacons T75. Laisser les cellules incuber à température ambiante pendant 8-10 minutes pour les détacher. Après incubation, mélanger délicatement les cellules avec 10 ml de milieu pour les remettre en suspension, puis centrifuger à 300xg pendant 3 minutes. Jeter le surnageant, remettre les cellules en suspension dans du milieu frais et les transférer dans de nouveaux flacons contenant déjà du milieu frais.
Split ratio	Un rapport de 1:3 à 1:6 est recommandé
Seeding density	1 x 10 ⁴ cellules/cm ²

Cellules U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple | 300461**Fluid renewal** 2 à 3 fois par semaine**Freeze medium** Comme milieu de cryoconservation, nous utilisons un milieu de croissance complet (comprenant du FBS) + 10 % de DMSO pour une viabilité adéquate après décongélation, ou CM-1 (numéro de catalogue 800100 de Cytion), qui comprend des osmoprotectants et des stabilisateurs métaboliques optimisés pour améliorer la récupération et réduire le stress induit par la cryogénéisation.**Thawing and Culturing Cells**

1. Confirmer que le flacon est toujours congelé à la livraison, car les cellules sont expédiées sur de la glace sèche pour maintenir des températures optimales pendant le transport.
2. Dès réception, soit conserver immédiatement le cryovial à des températures inférieures à -150°C pour assurer la préservation de l'intégrité cellulaire, soit passer à l'étape 3 si une mise en culture immédiate est nécessaire.
3. Pour une mise en culture immédiate, décongeler rapidement le flacon en l'immergeant dans un bain-marie à 37°C avec de l'eau propre et un agent antimicrobien, en l'agitant doucement pendant 40 à 60 secondes jusqu'à ce qu'il ne reste qu'un petit amas de glace.
4. Effectuer toutes les étapes suivantes dans des conditions stériles sous une hotte à flux, en désinfectant le cryovial avec de l'éthanol à 70 % avant de l'ouvrir.
5. Ouvrir soigneusement le flacon désinfecté et transférer la suspension cellulaire dans un tube à centrifuger de 15 ml contenant 8 ml de milieu de culture à température ambiante, en mélangeant doucement.
6. Centrifuger le mélange à 300 x g pendant 3 minutes pour séparer les cellules et jeter soigneusement le surnageant contenant le milieu de congélation résiduel.
7. Remettre doucement en suspension le culot cellulaire dans 10 ml de milieu de culture frais. Pour les cellules adhérentes, répartir la suspension entre deux flacons de culture T25 ; pour les cultures en suspension, transférer tout le milieu dans un seul flacon T25 afin de favoriser une interaction et une croissance efficaces des cellules.
8. Respecter les protocoles de sous-culture établis pour une croissance et un entretien continus de la lignée cellulaire, garantissant ainsi des résultats expérimentaux fiables.

Incubation Atmosphere 37°C, 5% CO_2 , atmosphère humidifiée.**Flask Coating** Aucun

Cellules U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple | 300461

Freezing Procedure

Les lignées cellulaires cryoconservées sont expédiées sur glace sèche dans des emballages isolés et validés, avec suffisamment de réfrigérant pour maintenir une température d'environ -78 °C tout au long du transport. À la réception, inspecter immédiatement le conteneur et transférer sans délai les flacons dans un lieu de stockage approprié.

Shipping Conditions

Les lignées cellulaires cryoconservées sont expédiées sur glace sèche dans des emballages isolés et validés, avec suffisamment de réfrigérant pour maintenir une température d'environ -78 °C tout au long du transport. À la réception, inspecter immédiatement le conteneur et transférer sans délai les flacons dans un lieu de stockage approprié.

Storage Conditions

Pour une conservation à long terme, placer les flacons dans de l'azote liquide en phase vapeur à une température comprise entre -150 et -196 °C environ. Le stockage à -80 °C n'est acceptable qu'en tant qu'étape intermédiaire de courte durée avant le transfert dans l'azote liquide.

Contrôle de qualité / Profil génétique / HLA

Sterility

La contamination par les mycoplasmes est exclue à l'aide de tests basés sur la PCR et de méthodes de détection des mycoplasmes basées sur la luminescence.

Pour s'assurer de l'absence de contamination bactérienne, fongique ou levurienne, les cultures cellulaires font l'objet d'inspections visuelles quotidiennes.