

U2OS-CRISPR-NUP96-SNAP sejtek | 300444**Általános információk****Description**

Az U-2 OS-CRISPR-NUP96-SNAP egy genetikailag módosított osteosarcoma-sejtvonal, amely az U-2 OS humán szülői sejtvonalból származik. Ezt a sejtvonalat CRISPR/Cas9 által közvetített genomszerkesztéssel úgy alakították át, hogy a NUP96 génhez SNAP-tagot építsenek be, ami lehetővé teszi a nukleáris pórus komplex dinamikájának vizualizálását és tanulmányozását. A nukleáris póruskomplexek (NPC-k) kulcsfontosságúak a nukleocitoplazmatikus transzport szabályozásában, és a NUP96 az NPC egyik jelentős összetevője, amely kulcsszerepet játszik annak strukturális integritásában és működésében.

Az U-2 OS-CRISPR-NUP96-SNAP 33. számú klónban a SNAP-tag integrálása a NUP96 lókuszba lehetővé teszi fluoreszcens szubsztrátok vagy más kémiai szondák specifikus és kovalens rögzítését, amelyek élő sejtek képalkotására és más biokémiai vizsgálatokra használhatók. Ez a tulajdonsága felbecsülhetetlen értékű eszközzé teszi a nukleocitoplazmatikus transzport molekuláris dinamikájának vizsgálatához, az NPC-vel kapcsolatos patológiák megértéséhez és az NPC funkciót befolyásoló terápiás vegyületek szűréséhez. A sejtvonal megtartja az U-2 OS szülői vonal jellemzőit is, amelyek közé tartozik a nagyfokú genetikai stabilitás és a könnyű tenyésztetőség, így alkalmas a nagy áteresztőképességű szűrésre és a sejtbiológiai vizsgálatok kiterjesztésére.

A NUP96 génnél végzett módosítás specifitása miatt az U-2 OS-CRISPR-NUP96-SNAP 33. számú klón egyedülálló modellt biztosít az NPC komponenseinek részletes tanulmányozásához a sejtműködés és -diszfunkció összefüggésében. A kutatók kihasználhatják a SNAP-tag rendszert a NUP96 szelektív és gyors jelölésére, megkönnyítve az NPC dinamikájának valós idejű vizualizálását fiziológiai és patológiai körülmények között. Ez a specifikus klón robusztus platformként szolgálhat mind az alap kutatás, mind az alkalmazott orvosi biológiai vizsgálatok számára, jelentősen hozzájárulva a sejtbiológia, a genetika és az onkológia területéhez.

Organism Emberi**Tissue** Csont**Disease** Osteosarcoma**Jellemzők****Age** 15 év**Gender** Női**Ethnicity** Kaukázusi**Growth properties** Adherent**Szabályozási adatok**

U2OS-CRISPR-NUP96-SNAP sejtek | 300444

Citation	U-2 OS-CRISPR-NUP96-SNAP (Cytion katalógusszám: 300444)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_B7FL
Depositor	Az Ellenberg Labor (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Ez a humán osteosarcoma sejtvonallal (U2OS-CRISPR-CRISPR-NUP96-SNAP, 33-as klón) egy CRISPR által módosított NUP96-SNAP fúziót tartalmaz, amely megkönnyíti a nukleáris pórusok SNAP-tag kémiai jelölését. A módosítás stabilan integrálódik. Ez az osztályozás csak Németországban érvényes, máshol ettől eltérhet.

Biomolekuláris adatok

Protein expression	NUP96-SNAP (nukleáris pórus komplex 96 fehérje, SNAP-tag)
---------------------------	---

A kezelése

Culture Medium	McCoy's 5a, w: 3,0 g/L glükóz, w: stabil glutamin, w: 2,0 mM nátrium-piruvát, w: 2,2 g/L NaHCO ₃ (Cytion cikkszám: 820200a)
Supplements	A táptalajt egészítsük ki 10% FBS-szel, 3,0 g/L glükózzal, stabil glutaminnal, 2,0 mM nátrium-piruváttal, 2,2 g/L NaHCO ₃ -mal, 1% NEAA-val
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Távolítsa el a régi táptalajt a megtapadt sejtekről, és mossa őket kalcium- és magnéziummentes PBS-szel. T25-ös lombikokhoz 3-5 ml PBS-t, T75-ös lombikokhoz pedig 5-10 ml-t használjunk. Ezután fedjük be a sejteket teljesen Accutase-zal, T25 lombikok esetében 1-2 ml-t, T75 lombikok esetében 2,5 ml-t használva. A sejteket 8-10 percig hagyjuk szobahőmérsékleten inkubálni, hogy leváljanak. Az inkubálás után óvatosan keverjük össze a sejteket 10 ml tápfolyadékkal, hogy reszuszpendáljuk őket, majd centrifugáljuk 300xg-nél 3 percig. Dobja el a felülúszót, szuszpendálja újra a sejteket friss tápfolyadékban, és helyezze át őket új lombikokba, amelyek már friss tápfolyadékot tartalmaznak.
Seeding density	1×10^4 sejt/cm ²
Fluid renewal	hetente 2-3 alkalommal

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

Krioprezerváló táptalajként teljes növekedési táptalajt (beleértve az FBS-t) + 10% DMSO-t használunk a megfelelő kiolvasztás utáni életképesség érdekében, vagy CM-1-et (Cytion katalógusszám: 800100), amely optimalizált ozmoprotektánsokat és metabolikus stabilizátorokat tartalmaz a regenerálódás fokozása és a krio-indukált stressz csökkentése érdekében.

Thawing and Culturing Cells

1. Ellenőrizze, hogy az injekciós üveg a szállításkor mélyhűtött marad-e, mivel a sejteket szárazjégen szállítják, hogy a szállítás során az optimális hőmérsékletet fenntartsák.
2. Átvételt követően vagy azonnal tárolja a krioampullát -150 °C alatti hőmérsékleten a sejtek integritásának megőrzése érdekében, vagy folytassa a 3. lépéssel, ha azonnali tenyésztésre van szükség.
3. Azonnali tenyésztés esetén gyorsan fel kell olvasztani az injekciós üveget úgy, hogy tiszta vízzel és antimikrobiális szerrel ellátott 37 °C -os vízfürdőbe merítjük, és 40-60 másodpercig óvatosan kevergetjük, amíg egy kis jégcsomó nem marad.
4. Az összes további lépést steril körülmények között, áramlásos elszívóban végezzük el, és nyitás előtt fertőtlenítsük a krioümlékét 70%-os etanollal.
5. Óvatosan nyissa fel a fertőtlenített fiolát, és a sejtszuszpenziót óvatosan összekeverve helyezze át egy 15 ml-es centrifugacsőbe, amely 8 ml szobahőmérsékletű táptalajt tartalmaz.
6. Centrifugáljuk az elegyet $300 \times g$ -n 3 percig a sejtek szétválasztásához, és óvatosan dobjuk el a maradék fagyasztóközeget tartalmazó felülúszót.
7. Óvatosan szuszpendáljuk újra a sejt pelletet 10 ml friss táptalajban. Adhezív sejtek esetében ossza a szuszpenziót két T25-ös tenyésztőlombik között; szuszpenziós kultúrák esetében az összes tápfolyadékot tegye át egy T25-ös lombikba a hatékony sejt kölcsönhatás és növekedés elősegítése érdekében.
8. A sejtvonal folyamatos növekedése és fenntartása érdekében tartsa be a megállapított szubkultúra protokollokat, biztosítva a megbízható kísérleti eredményeket.

Incubation Atmosphere

37 °C , 5% CO_2 , párasított légkör.

Flask Coating

Nincs

Freezing Procedure

A kriokonzervált sejtvonalakat szárazjégen, validált, szigetelt csomagolásban szállítják, elegendő hűtőközeggel, hogy a szállítás során a hőmérsékletet körülbelül -78 °C -on tartsák. Átvételkor azonnal vizsgálja meg a tárolóedényt, és haladéktalanul helyezze át az injekciós üvegeket a megfelelő tárolóhelyre.

U2OS-CRISPR-NUP96-SNAP sejtek | 300444

Shipping Conditions

A kriokonzervált sejt vonalakat szárazjégen, validált, szigetelt csomagolásban szállítják, elegendő hűtőközeggel, hogy a szállítás során a hőmérsékletet körülbelül $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartsák. Átvételkor azonnal vizsgálja meg a tárolóedényt, és haladéktalanul helyezze át az injekciós üvegeket a megfelelő tárolóhelyre.

Storage Conditions

Hosszú távú tartósítás céljából helyezze az üvegeket gőzfázisú folyékony nitrogénbe, körülbelül -150 és $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérsékleten. A $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő tárolás csak rövid átmeneti lépésként fogadható el a folyékony nitrogénbe való átvitel előtt.

Minőségellenőrzés / Genetikai profil / HLA

Sterility

A mikoplazma-szennyeződést mind a PCR-alapú vizsgálatokkal, mind a lumineszcencia-alapú mikoplazma-kimutatási módszerekkel kizárják.

A bakteriális, gombás vagy élesztőgombás szennyeződés elkerülése érdekében a sejt kultúrákat napi vizuális ellenőrzésnek vetik alá.