

**Cellule U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple | 300461****Informazioni generali****Description**

U-2 OS-CRISPR-NUP96-mMaple è una linea cellulare di osteosarcoma geneticamente modificata derivata dalla linea cellulare umana U-2 OS, nota per le sue robuste caratteristiche di crescita e per la sua utilità in vari studi biologici. Questo particolare clone è stato modificato utilizzando la tecnologia di editing genico CRISPR/Cas9 per incorporare mMaple, una proteina fluorescente fotoconvertibile, nel gene NUP96. La proteina mMaple consente di utilizzare tecniche di imaging avanzate come l'imaging di cellule vive e la microscopia a super-risoluzione, fornendo approfondimenti dinamici sul comportamento del complesso del poro nucleare (NPC) e sui meccanismi di importazione ed esportazione delle cellule attraverso l'involucro nucleare.

Il gene NUP96, che codifica un componente cruciale della NPC, è fondamentale per il trasporto nucleocitoplasmatico. L'alterazione di NUP96 può influenzare non solo i meccanismi di trasporto, ma anche l'architettura e la funzione nucleare complessiva. Questa linea cellulare funge quindi da modello eccellente per studiare le patologie legate alla NPC e il ruolo del trasporto nucleare nel metabolismo e nella segnalazione cellulare. L'integrazione di mMaple in NUP96 consente il tracciamento e la visualizzazione in tempo reale delle dinamiche di NUP96, rendendolo uno strumento indispensabile per i ricercatori che si occupano di studi sul nucleo cellulare e per quelli che esplorano le implicazioni delle disfunzioni della NPC in malattie come il cancro e le infezioni virali.

Come strumento specializzato, il clone U-2 OS-CRISPR-NUP96-mMaple n.16 supporta l'imaging ad alta risoluzione e fornisce dati sostanziali sulla distribuzione spaziale e temporale dei componenti della NPC. È particolarmente prezioso per gli esperimenti che richiedono un'analisi dettagliata dell'espressione genica, della localizzazione delle proteine e del trasporto nucleare in condizioni fisiologiche e patologiche, facilitando una comprensione più approfondita dei processi cellulari a livello molecolare.

**Organism** Umano**Tissue** Osso**Disease** Osteosarcoma**Caratteristiche****Age** 15 anni**Gender** Donna**Ethnicity** Caucasico**Growth properties** Aderente**Dati normativi**

**Cellule U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple | 300461**

<b>Citation</b>	U-2 OS-CRISPR-NUP96-mMaple (numero di catalogo Cytion 300461)
<b>Biosafety level</b>	1
<b>NCBI_TaxID</b>	9606
<b>CellosaurusAccession</b>	CVCL_B7FK
<b>Depositor</b>	Il laboratorio Ellenberg (EMBL)
<b>GMO Status</b>	GMO-S1: questa linea cellulare di osteosarcoma umano (U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple, clone 16) contiene una fusione NUP96-maple mediata da CRISPR che consente l'etichettatura fotoconvertibile delle strutture dei pori nucleari. Il costruito è presente in modo stabile. Questa classificazione si applica solo in Germania e può differire altrove.

**Dati biomolecolari**

<b>Protein expression</b>	NUP96-mMaple (proteina 96 del complesso del poro nucleare endogeno, marcata mMaple)
---------------------------	---

**Manipolazione**

<b>Culture Medium</b>	McCoy's 5a, w: 3,0 g/L Glucosio, w: Glutammina stabile, w: 2,0 mM Sodio piruvato, w: 2,2 g/L NaHCO <sub>3</sub> (articolo Cytion numero 820200a)
<b>Supplements</b>	Integrare il terreno di coltura con 10% FBS, 1% NEAA
<b>Dissociation Reagent</b>	Accutase
<b>Subculturing</b>	Rimuovere il vecchio terreno dalle cellule aderenti e lavarle con PBS privo di calcio e magnesio. Per le fiasche T25, utilizzare 3-5 ml di PBS e per le fiasche T75, 5-10 ml. Quindi, coprire completamente le cellule con Accutase, utilizzando 1-2 ml per le fiasche T25 e 2,5 ml per le fiasche T75. Lasciare incubare le cellule a temperatura ambiente per 8-10 minuti per staccarle. Dopo l'incubazione, mescolare delicatamente le cellule con 10 ml di terreno per risospenderle, quindi centrifugare a 300xg per 3 minuti. Scartare il surnatante, risospendere le cellule in terreno fresco e trasferirle in nuove fiasche contenenti terreno fresco.
<b>Split ratio</b>	Si consiglia un rapporto da 1:3 a 1:6
<b>Seeding density</b>	1 x 10 <sup>4</sup> cellule/cm <sup>2</sup>
<b>Fluid renewal</b>	da 2 a 3 volte alla settimana

**Cellule U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple | 300461****Freeze medium**

Come terreno di crioconservazione, utilizziamo un terreno di crescita completo (incluso FBS) + 10% DMSO per un'adeguata vitalità post-scongelo, o CM-1 (numero di catalogo Cytion 800100), che include osmoprotettori e stabilizzatori metabolici ottimizzati per migliorare il recupero e ridurre lo stress crio-indotto.

**Thawing and Culturing Cells**

1. Verificare che la fiala rimanga profondamente congelata al momento della consegna, poiché le cellule vengono spedite con ghiaccio secco per mantenere le temperature ottimali durante il trasporto.
2. Al ricevimento, conservare immediatamente la criovial a temperature inferiori a -150°C per garantire la conservazione dell'integrità cellulare, oppure procedere al punto 3 se è necessaria una coltura immediata.
3. Per la coltura immediata, scongelare rapidamente la fiala immergendola in un bagno d'acqua a 37°C con acqua pulita e un agente antimicrobico, agitando delicatamente per 40-60 secondi finché non rimane un piccolo grumo di ghiaccio.
4. Eseguire tutte le fasi successive in condizioni di sterilità in una cappa a flusso, disinfettando la criovial con etanolo al 70% prima dell'apertura.
5. Aprire con cautela la fiala disinfettata e trasferire la sospensione cellulare in una provetta da centrifuga da 15 ml contenente 8 ml di terreno di coltura a temperatura ambiente, mescolando delicatamente.
6. Centrifugare la miscela a 300 x g per 3 minuti per separare le cellule e scartare con cura il surnatante contenente il terreno di coltura residuo.
7. Risospendere delicatamente il pellet cellulare in 10 ml di terreno di coltura fresco. Per le cellule aderenti, dividere la sospensione tra due fiasche di coltura T25; per le colture in sospensione, trasferire tutto il terreno in una fiasca T25 per promuovere l'interazione e la crescita delle cellule.
8. Attenersi ai protocolli di subcoltura stabiliti per la crescita e il mantenimento continui della linea cellulare, garantendo risultati sperimentali affidabili.

**Incubation Atmosphere**

37°C, 5%<sub>CO2</sub>, atmosfera umidificata.

**Flask Coating**

Nessuno

**Freezing Procedure**

Le linee cellulari crioconservate vengono spedite su ghiaccio secco in confezioni isolate e convalidate, con una quantità di refrigerante sufficiente a mantenere circa -78 °C durante il trasporto. Al ricevimento, ispezionare immediatamente il contenitore e trasferire immediatamente le fiale in un luogo di conservazione appropriato.

## Cellule U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple | 300461

### Shipping Conditions

Le linee cellulari crioconservate vengono spedite su ghiaccio secco in confezioni isolate e convalidate, con una quantità di refrigerante sufficiente a mantenere circa -78 °C durante il trasporto. Al ricevimento, ispezionare immediatamente il contenitore e trasferire immediatamente le fiale in un luogo di conservazione appropriato.

### Storage Conditions

Per la conservazione a lungo termine, porre le fiale in azoto liquido in fase vapore a una temperatura compresa tra -150 e -196 °C circa. La conservazione a -80 °C è accettabile solo come breve fase intermedia prima del trasferimento in azoto liquido.

## Controllo di qualità / Profilo genetico / HLA

### Sterility

La contaminazione da micoplasma viene esclusa utilizzando sia saggi basati sulla PCR sia metodi di rilevamento del micoplasma basati sulla luminescenza.

Per garantire l'assenza di contaminazione batterica, fungina o da lieviti, le colture cellulari sono sottoposte a ispezioni visive quotidiane.