

Cellule U2OS-CRISPR-NUP96-SNAP | 300444**Informazioni generali****Description**

U-2 OS-CRISPR-NUP96-SNAP è una linea cellulare geneticamente modificata di osteosarcoma derivata dalla linea cellulare umana U-2 OS. Questa linea cellulare è stata ingegnerizzata attraverso l'editing del genoma mediato da CRISPR/Cas9 per incorporare un SNAP-tag al gene NUP96, consentendo la visualizzazione e lo studio delle dinamiche del complesso dei pori nucleari. I complessi dei pori nucleari (NPC) sono cruciali per la regolazione del trasporto nucleocitoplasmatico e NUP96 è un componente significativo dell'NPC, svolgendo un ruolo centrale nella sua integrità strutturale e nella sua funzione.

Nel clone U-2 OS-CRISPR-NUP96-SNAP n.33, l'integrazione dell'etichetta SNAP al locus NUP96 consente l'attacco specifico e covalente di substrati fluorescenti o altre sonde chimiche che possono essere utilizzate per l'imaging di cellule vive e altri saggi biochimici. Questa caratteristica la rende uno strumento prezioso per lo studio delle dinamiche molecolari del trasporto nucleocitoplasmatico, per la comprensione delle patologie legate alla NPC e per lo screening di composti terapeutici che influenzano la funzione della NPC. La linea cellulare mantiene inoltre le caratteristiche della linea parentale U-2 OS, tra cui un elevato livello di stabilità genetica e facilità di coltura, che la rendono adatta per lo screening ad alta produttività e per studi estesi di biologia cellulare.

Grazie alla specificità della modifica del gene NUP96, il clone U-2 OS-CRISPR-NUP96-SNAP n.33 rappresenta un modello unico per lo studio dettagliato dei componenti della NPC nel contesto della funzione e della disfunzione cellulare. I ricercatori possono sfruttare il sistema SNAP-tag per etichettare selettivamente e rapidamente NUP96, facilitando la visualizzazione in tempo reale delle dinamiche delle NPC in condizioni fisiologiche e patologiche. Questo clone specifico può fungere da solida piattaforma per la ricerca di base e gli studi biomedici applicati, contribuendo in modo significativo ai campi della biologia cellulare, della genetica e dell'oncologia.

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

Cellule U2OS-CRISPR-NUP96-SNAP | 300444

Citation	U-2 OS-CRISPR-NUP96-SNAP (numero di catalogo Cytion 300444)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_B7FL
Depositor	Il laboratorio Ellenberg (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: questa linea cellulare di osteosarcoma umano (U2OS-CRISPR-NUP96-SNAP, clone 33) contiene una fusione NUP96-SNAP modificata da CRISPR che facilita l'etichettatura chimica SNAP-tag dei pori nucleari. La modifica è integrata in modo stabile. Questa classificazione si applica solo in Germania e può differire altrove.

Dati biomolecolari

Protein expression	NUP96-SNAP (proteina 96 del complesso del poro nucleare, SNAP-tag)
---------------------------	--

Manipolazione

Culture Medium	McCoy's 5a, w: 3,0 g/L Glucosio, w: Glutamina stabile, w: 2,0 mM Sodio piruvato, w: 2,2 g/L NaHCO ₃ (articolo Cytion numero 820200a)
Supplements	Integrare il terreno di coltura con 10% FBS, 3,0 g/L di glucosio, Glutamina stabile, 2,0 mM di piruvato di sodio, 2,2 g/L di NaHCO ₃ , 1% di NEAA
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	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.
Split ratio	Si consiglia un rapporto da 1:4 a 1:6
Seeding density	1 x 10 ⁴ cellule/cm ²

Cellule U2OS-CRISPR-NUP96-SNAP | 300444**Fluid renewal** da 2 a 3 volte alla settimana**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% CO_2 , atmosfera umidificata.**Flask Coating** Nessuno

Cellule U2OS-CRISPR-NUP96-SNAP | 300444

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.

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.

Profilo STR

Amelogenin: x,y