

Komórki U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple | 300461**Informacje ogólne****Description**

U-2 OS-CRISPR-NUP96-mMaple to genetycznie zmodyfikowana linia komórek kostniakomięsa pochodząca z ludzkiej linii komórkowej U-2 OS, znanej z silnej charakterystyki wzrostu i użyteczności w różnych badaniach biologicznych. Ten konkretny klon został zmodyfikowany przy użyciu technologii edycji genów CRISPR/Cas9 w celu włączenia mMaple, fotokonwertowalnego białka fluorescencyjnego, do genu NUP96. Białko mMaple pozwala na zaawansowane techniki obrazowania, takie jak obrazowanie żywych komórek i mikroskopia superrozdzielcza, zapewniając dynamiczny wgląd w zachowanie kompleksu porów jądrowych (NPC) i mechanizmy importu-eksportu komórek przez otoczkę jądrową.

Gen NUP96, który koduje kluczowy składnik NPC, jest niezbędny do transportu nukleocytoplazmatycznego. Zmiana NUP96 może wpływać nie tylko na mechanizmy transportu, ale także na ogólną architekturę i funkcję jądra. Ta linia komórkowa służy zatem jako doskonały model do badania patologii związanych z NPC oraz roli transportu jądrowego w metabolizmie i sygnalizacji komórkowej. Integracja mMaple z NUP96 pozwala na śledzenie w czasie rzeczywistym i wizualizację dynamiki NUP96 in vivo, co czyni go niezbędnym narzędziem dla naukowców koncentrujących się na badaniach jądra komórkowego i tych badających konsekwencje dysfunkcji NPC w chorobach takich jak rak i infekcje wirusowe.

Jako wyspecjalizowane narzędzie, klon U-2 OS-CRISPR-NUP96-mMaple no.16 obsługuje obrazowanie w wysokiej rozdzielczości i dostarcza istotnych danych dotyczących przestrzennego i czasowego rozkładu składników NPC. Jest szczególnie cenny w eksperymentach wymagających szczegółowej analizy ekspresji genów, lokalizacji białek i transportu jądrowego w warunkach fizjologicznych i patologicznych, ułatwiając głębsze zrozumienie procesów komórkowych na poziomie molekularnym.

Organism

Człowiek

Tissue

Kość

Disease

Mięsak kościopochodny

Charakterystyka**Age**

15 lat

Gender

Kobieta

Ethnicity

Kaukaski

Growth properties

Adherent

Dane regulacyjne

Komórki U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple | 300461

Citation	U-2 OS-CRISPR-NUP96-mMaple (numer katalogowy Cytion 300461)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_B7FK
Depositor	Laboratorium Ellenberg (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Ta ludzka linia komórek kostniakomięsaka (U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple, klon 16) zawiera fuzję NUP96-mMaple za pośrednictwem CRISPR umożliwiającą fotokonwertowalne znakowanie struktur porów jądrowych. Konstrukcja jest stabilnie obecna. Ta klasyfikacja ma zastosowanie tylko w Niemczech i może się różnić w innych krajach.

Dane biomolekularne

Protein expression	NUP96-mMaple (endogenne białko kompleksu porów jądrowych 96, znakowane mMaple)
---------------------------	--

Obsługa

Culture Medium	McCoy's 5a, w: 3,0 g/l glukozy, w: stabilna glutamina, w: 2,0 mM pirogromianu sodu, w: 2,2 g/l NaHCO ₃ (numer artykułu Cytion 820200a)
Supplements	Uzupełnić podłoże 10% FBS, 1% NEAA
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Usuń starą pożywkę z przylegających komórek i przemyj je PBS, który nie zawiera wapnia i magnezu. W przypadku kolb T25 należy użyć 3-5 ml PBS, a w przypadku kolb T75 5-10 ml. Następnie całkowicie pokryj komórki Accutase, używając 1-2 ml dla kolb T25 i 2,5 ml dla kolb T75. Pozwól komórkom inkubować w temperaturze pokojowej przez 8-10 minut, aby je oddzielić. Po inkubacji delikatnie wymieszaj komórki z 10 ml pożywki, aby ponownie je zawiesić, a następnie odwiruj przy 300xg przez 3 minuty. Odrzuć supernatant, ponownie zawiesić komórki w świeżej pożywce i przenieść je do nowych kolb zawierających już świeżą pożywkę.
Split ratio	Zalecane są proporcje od 1:3 do 1:6
Seeding density	1×10^4 komórek/cm ²
Fluid renewal	2 do 3 razy w tygodniu

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

Jako pożywki do kriokonserwacji używamy kompletnej pożywki wzrostowej (w tym FBS) + 10% DMSO w celu zapewnienia odpowiedniej żywotności po rozmrożeniu lub CM-1 (numer katalogowy Cytion 800100), która zawiera zoptymalizowane osmoprotektanty i stabilizatory metaboliczne w celu zwiększenia regeneracji i zmniejszenia stresu wywołanego kriokonserwacją.

Thawing and Culturing Cells

1. Upewnij się, że fiolka pozostaje głęboko zamrożona w momencie dostawy, ponieważ komórki są wysłane w suchym lodzie, aby utrzymać optymalną temperaturę podczas transportu.
2. Po otrzymaniu należy natychmiast przechowywać fiolkę w temperaturze poniżej -150°C , aby zapewnić zachowanie integralności komórek, lub przejść do kroku 3, jeśli wymagana jest natychmiastowa hodowla.
3. W przypadku natychmiastowej hodowli należy szybko rozmrozić fiolkę, zanurzając ją w łaźni wodnej o temperaturze 37°C z czystą wodą i środkiem przeciwdrobnoustrojowym, delikatnie mieszając przez 40-60 sekund, aż pozostanie niewielka grudka lodu.
4. Wykonaj wszystkie kolejne kroki w sterylnych warunkach w kapturze przepływowej, dezynfekując fiolkę 70% etanolem przed otwarciem.
5. Ostrożnie otworzyć zdezynfekowaną fiolkę i przenieść zawiesinę komórek do 15 ml próbówki wirówkowej zawierającej 8 ml podłoża hodowlanego o temperaturze pokojowej, delikatnie mieszając.
6. Wirować mieszaninę z prędkością $300 \times g$ przez 3 minuty w celu oddzielenia komórek i ostrożnie odrzucić supernatant zawierający pozostałości pożywki do zamrażania.
7. Delikatnie ponownie zawiesić osad komórek w 10 ml świeżego podłoża hodowlanego. W przypadku komórek przylegających, rozdzielić zawiesinę pomiędzy dwie kolby hodowlane T25; w przypadku hodowli zawiesinowych, przenieść całą pożywkę do jednej kolby T25 w celu promowania skutecznej interakcji i wzrostu komórek.
8. Przestrzegaj ustalonych protokołów podhodowli w celu ciągłego wzrostu i utrzymania linii komórkowej, zapewniając wiarygodne wyniki eksperymentów.

Incubation Atmosphere

37°C , 5% CO_2 , nawilżona atmosfera.

Flask Coating

Brak

Komórki U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple | 300461

Freezing Procedure

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiolki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Shipping Conditions

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiolki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Storage Conditions

W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiolki w ciekłym azocie w fazie lotnej w temperaturze od -150 do -196°C . Przechowywanie w temperaturze -80°C jest dopuszczalne tylko jako krótki etap przejściowy przed przeniesieniem do ciekłego azotu.

Kontrola jakości / Profil genetyczny / HLA

Sterility

Zanieczyszczenie mykoplazmą jest wykluczone przy użyciu zarówno testów opartych na PCR, jak i metod wykrywania mykoplazmy opartych na luminescencji.

Aby upewnić się, że nie ma zanieczyszczenia bakteriami, grzybami lub drożdżami, hodowle komórkowe są poddawane codziennym kontrolom wizualnym.