

**Komórki U2OS-CRISPR-NUP96-SNAP | 300444****Informacje ogólne****Description**

U-2 OS-CRISPR-NUP96-SNAP to genetycznie zmodyfikowana linia komórek kostniakomięsaka pochodząca z macierzystej ludzkiej linii komórkowej U-2 OS. Ta linia komórkowa została zmodyfikowana poprzez edycję genomu za pomocą CRISPR/Cas9 w celu włączenia znacznika SNAP do genu NUP96, umożliwiając wizualizację i badanie dynamiki kompleksu porów jądrowych. Kompleksy porów jądrowych (NPC) mają kluczowe znaczenie dla regulacji transportu nukleocytoplazmatycznego, a NUP96 jest istotnym składnikiem NPC, odgrywając kluczową rolę w jego integralności strukturalnej i funkcji.

W klonie U-2 OS-CRISPR-NUP96-SNAP nr 33, integracja znacznika SNAP w locus NUP96 pozwala na specyficzne i kowalencyjne przyłączanie fluorescencyjnych substratów lub innych sond chemicznych, które mogą być wykorzystywane do obrazowania żywych komórek i innych testów biochemicznych. Ta cecha sprawia, że jest to nieocenione narzędzie do badania dynamiki molekularnej transportu nukleocytoplazmatycznego, zrozumienia patologii związanych z NPC i badania przesiewowego związków terapeutycznych, które wpływają na funkcję NPC. Linia komórkowa zachowuje również cechy macierzystej linii U-2 OS, w tym wysoki poziom stabilności genetycznej i łatwość hodowli, dzięki czemu nadaje się do wysokowydajnych badań przesiewowych i rozszerzonych badań w biologii komórki.

Ze względu na specyficzność modyfikacji w genie NUP96, klon U-2 OS-CRISPR-NUP96-SNAP nr 33 stanowi unikalny model do szczegółowego badania składników NPC w kontekście funkcji i dysfunkcji komórek. Naukowcy mogą wykorzystać system znaczników SNAP do selektywnego i szybkiego znakowania NUP96, ułatwiając wizualizację dynamiki NPC w czasie rzeczywistym w warunkach fizjologicznych i patologicznych. Ten specyficzny klon może służyć jako solidna platforma zarówno do badań podstawowych, jak i stosowanych badań biomedycznych, wnosząc znaczący wkład w dziedziny biologii komórkowej, genetyki i onkologii.

**Organism** Człowiek**Tissue** Kość**Disease** Mięsak kościopochodny**Charakterystyka****Age** 15 lat**Gender** Kobieta**Ethnicity** Kaukaski**Growth properties** Adherent**Dane regulacyjne**

**Komórki U2OS-CRISPR-NUP96-SNAP | 300444**

<b>Citation</b>	U-2 OS-CRISPR-NUP96-SNAP (numer katalogowy Cytion 300444)
<b>Biosafety level</b>	1
<b>NCBI_TaxID</b>	9606
<b>CellosaurusAccession</b>	CVCL_B7FL
<b>Depositor</b>	Laboratorium Ellenberg (EMBL)
<b>GMO Status</b>	GMO-S1: Ta ludzka linia komórek kostniakomięsaka (U2OS-CRISPR-NUP96-SNAP, klon 33) zawiera zmodyfikowaną metodą CRISPR fuzję NUP96-SNAP ułatwiającą chemiczne znakowanie porów jądrowych znacznikiem SNAP. Modyfikacja jest stabilnie zintegrowana. Ta klasyfikacja ma zastosowanie tylko w Niemczech i może się różnić w innych krajach.

**Dane biomolekularne**

<b>Protein expression</b>	NUP96-SNAP (białko kompleksu porów jądrowych 96, znacznik SNAP)
---------------------------	---

**Obsługa**

<b>Culture Medium</b>	McCoy's 5a, w: 3,0 g/l glukozy, w: stabilna glutamina, w: 2,0 mM pirogromianu sodu, w: 2,2 g/l NaHCO <sub>3</sub> (numer artykułu Cytion 820200a)
<b>Supplements</b>	Uzupełnić pożywkę o 10% FBS, 3,0 g/l glukozy, stabilną glutaminę, 2,0 mM pirogromianu sodu, 2,2 g/l NaHCO <sub>3</sub> , 1% NEAA
<b>Dissociation Reagent</b>	Accutase
<b>Subculturing</b>	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.
<b>Split ratio</b>	Zalecane są proporcje od 1:4 do 1:6
<b>Seeding density</b>	$1 \times 10^4$ komórek/cm <sup>2</sup>

**Komórki U2OS-CRISPR-NUP96-SNAP | 300444****Fluid renewal** 2 do 3 razy w tygodniu**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 wysyłane w suchym lodzie, aby utrzymać optymalną temperaturę podczas transportu.
2. Po otrzymaniu należy natychmiast przechowywać fiolkę w temperaturze poniżej  $-150^{\circ}\text{C}$ , 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  $37^{\circ}\text{C}$  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 probówki 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** $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , nawilżona atmosfera.**Flask Coating**

Brak

## Komórki U2OS-CRISPR-NUP96-SNAP | 300444

### 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 fiołki 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 fiołki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

### Storage Conditions

W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiołki 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.

### Profil STR

Amelogenin: x,y