

Komórki U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP | 300174**Informacje ogólne****Description**

U-2 OS-CRISPR-NUP96-mEGFP to genetycznie zmodyfikowana linia komórkowa pochodząca z linii macierzystej ludzkiego kostniakomięsa U-2 OS. Ta linia komórkowa zawiera ukierunkowaną insercję monomerycznego znacznika Enhanced Green Fluorescent Protein (mEGFP) w locus genu NUP96, uzyskaną za pomocą technologii edycji genów CRISPR-Cas9. NUP96, część kompleksu porów jądrowych, jest niezbędny do transportu jądrowego, a jego fuzja z mEGFP pozwala na wizualizację dynamiki porów jądrowych w czasie rzeczywistym pod mikroskopem fluorescencyjnym, zapewniając cenny wgląd w mechanizmy transportu jądrowego i handel nukleocytoplazmatyczny.

Ten konkretny klon, oznaczony numerem 195, został wybrany ze względu na stabilną ekspresję białka fuzyjnego NUP96-mEGFP i zachowuje typowe cechy linii U-2 OS, w tym solidną strukturę cytoszkieletu, która ma kluczowe znaczenie w badaniach związanych z migracją komórek nowotworowych i przerzutami. Zastosowanie technologii CRISPR zapewnia precyzyjną edycję genów, minimalizując efekty off-target, które mogłyby zagrozić integralności wyników eksperymentalnych. Sprawia to, że klon U-2 OS-CRISPR-NUP96-mEGFP nr 195 jest szczególnie przydatny w technikach obrazowania o wysokiej rozdzielczości i szczegółowych badaniach architektury komórkowej, pomagając w zaawansowanych badaniach w biologii komórkowej, badaniach nad rakiem i zjawiskach transportu jądrowego.

Organism Człowiek**Tissue** Kość**Disease** Mięsak kościopochodny**Charakterystyka****Age** 15 lat**Gender** Kobieta**Ethnicity** Kaukaski**Morphology** Podobny do nabłonka**Growth properties** Adherent**Dane regulacyjne****Citation** Klon U-2 OS-CRISPR-NUP96-mEGFP nr 195 (numer katalogowy Cytion 300174)

Komórki U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP | 300174**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_B7FJ**Depositor** Laboratorium Ellenberg (EMBL)

GMO Status GMO-S1: Ta ludzka linia komórek kostniakomięsaka (U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP, klon 195) zawiera zmodyfikowaną za pomocą CRISPR fuzję NUP96-mEGFP wprowadzoną za pomocą lentiwirusa, umożliwiającą fluorescencyjne śledzenie kompleksów porów jądrowych. Modyfikacja jest stabilnie zintegrowana. Ta klasyfikacja ma zastosowanie tylko w Niemczech i może się różnić w innych krajach.

Dane biomolekularne

Protein expression MEGFP (białko kompleksu porów jądrowych 96, znakowane mEGFP)

Obsługa

Culture Medium McCoys 5a, w: 3,0 g/l glukozy, w: stabilna glutamina, w: 2,0 mM pirogronianu sodu, w: 2,2 g/l NaHCO₃ (numer artykułu Cytion 820200a)

Supplements Uzuppełnić 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 Zaleca się stosowanie proporcji 1:2 co 2-3 dni. Może być przechowywany do 1 dnia po konfluencji

Seeding density 2 do 3×10^4 komórek/cm²

Fluid renewal 2 do 3 razy w tygodniu

Komórki U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP | 300174**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°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 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°C , 5% CO_2 , nawilżona atmosfera.

Flask Coating

Brak

Komórki U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP | 300174

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

PEZ6: CLS-354