

Células U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple | 300461**Informações gerais****Description**

A U-2 OS-CRISPR-NUP96-mMaple é uma linha celular de osteossarcoma geneticamente modificada derivada da linha celular humana U-2 OS, conhecida pelas suas características de crescimento robustas e utilidade em vários estudos biológicos. Este clone específico foi modificado utilizando a tecnologia de edição de genes CRISPR/Cas9 para incorporar mMaple, uma proteína fluorescente fotoconversível, no gene NUP96. A proteína mMaple permite a utilização de técnicas avançadas de imagiologia, como a imagiologia de células vivas e a microscopia de super-resolução, proporcionando uma visão dinâmica do comportamento do complexo de poros nucleares (NPC) e dos mecanismos de importação-exportação celular através do envelope nuclear.

O gene NUP96, que codifica um componente crucial do NPC, é vital para o transporte nucleocitoplasmático. A alteração do NUP96 pode afetar não só os mecanismos de transporte, mas também a arquitetura e a função nucleares em geral. Assim, esta linha celular constitui um excelente modelo para estudar patologias relacionadas com o NPC e o papel do transporte nuclear no metabolismo e na sinalização celular. A integração do mMaple na NUP96 permite o rastreamento e a visualização em tempo real da dinâmica da NUP96 in vivo, tornando-a uma ferramenta indispensável para os investigadores que se dedicam ao estudo do núcleo celular e para os que exploram as implicações das disfunções da NPC em doenças como o cancro e as infeções virais.

Como ferramenta especializada, o clone U-2 OS-CRISPR-NUP96-mMaple n.º 16 suporta imagens de alta resolução e fornece dados substanciais sobre a distribuição espacial e temporal dos componentes do NPC. É particularmente valioso para experiências que requerem uma análise detalhada da expressão genética, localização de proteínas e transporte nuclear em condições fisiológicas e patológicas, facilitando uma compreensão mais profunda dos processos celulares a nível molecular.

Organism Humano**Tissue** Osso**Disease** Osteossarcoma**Caraterísticas****Age** 15 anos**Gender** Feminino**Ethnicity** Caucasiano**Growth properties** Aderente**Dados regulamentares**

Células U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple | 300461

Citation	U-2 OS-CRISPR-NUP96-mMaple (número de catálogo Cytion 300461)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_B7FK
Depositor	O Laboratório Ellenberg (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Esta linha celular de osteossarcoma humano (U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple, clone 16) contém uma fusão NUP96-mMaple mediada por CRISPR que permite a marcação fotoconversível de estruturas de poros nucleares. A construção está presente de forma estável. Esta classificação aplica-se apenas na Alemanha e pode diferir noutros países.

Dados biomoleculares

Protein expression	NUP96-mMaple (proteína endógena do complexo de poro nuclear 96, marcada com mMaple)
---------------------------	---

Manuseamento

Culture Medium	McCoy's 5a, com: 3,0 g/L de glucose, com: glutamina estável, com: 2,0 mM de piruvato de sódio, com: 2,2 g/L de NaHCO ₃ (número de artigo Cytion 820200a)
Supplements	Suplementar o meio com 10% de FBS, 1% de NEAA
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Retirar o meio antigo das células aderentes e lavá-las com PBS sem cálcio e magnésio. Nos frascos T25, utilizar 3-5 ml de PBS e, nos frascos T75, 5-10 ml. Em seguida, cobrir completamente as células com Accutase, utilizando 1-2 ml para os frascos T25 e 2,5 ml para os frascos T75. Deixar as células incubar à temperatura ambiente durante 8-10 minutos para as destacar. Após a incubação, misturar suavemente as células com 10 ml de meio para as ressuspender e, em seguida, centrifugar a 300xg durante 3 minutos. Deitar fora o sobrenadante, ressuspender as células em meio fresco e transferi-las para novos frascos que já contenham meio fresco.
Seeding density	1 x 10 ⁴ células/cm ²
Fluid renewal	2 a 3 vezes por semana

Células U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple | 300461

Freeze medium

Como meio de criopreservação, utilizamos um meio de crescimento completo (incluindo FBS) + 10% DMSO para uma viabilidade pós-descongelamento adequada, ou CM-1 (número de catálogo Cytion 800100), que inclui osmoprotectores otimizados e estabilizadores metabólicos para melhorar a recuperação e reduzir o stress induzido pela crio.

Thawing and Culturing Cells

1. Confirme que o frasco permanece profundamente congelado aquando da entrega, uma vez que as células são enviadas em gelo seco para manter as temperaturas ideais durante o transporte.
2. Após a receção, armazenar o frasco criogénico imediatamente a temperaturas inferiores a -150°C para garantir a preservação da integridade celular, ou avançar para o passo 3 se for necessária uma cultura imediata.
3. Para uma cultura imediata, descongelar rapidamente o frasco imergindo-o num banho de água a 37°C com água limpa e um agente antimicrobiano, agitando suavemente durante 40-60 segundos até ficar um pequeno aglomerado de gelo.
4. Efetuar todos os passos subsequentes em condições estéreis numa capela de fluxo, desinfetando o frasco criogénico com etanol a 70% antes de o abrir.
5. Abrir cuidadosamente o frasco desinfetado e transferir a suspensão de células para um tubo de centrifugação de 15 ml contendo 8 ml de meio de cultura à temperatura ambiente, misturando suavemente.
6. Centrifugar a mistura a 300 x g durante 3 minutos para separar as células e eliminar cuidadosamente o sobrenadante que contém o meio de congelação residual.
7. Ressuspender suavemente o pellet de células em 10 ml de meio de cultura fresco. No caso de células aderentes, dividir a suspensão entre dois frascos de cultura T25; no caso de culturas em suspensão, transferir todo o meio para um frasco T25 para promover uma interação e um crescimento eficazes das células.
8. Cumprir os protocolos de subcultura estabelecidos para o crescimento e manutenção contínuos da linha celular, garantindo resultados experimentais fiáveis.

Incubation Atmosphere

37°C, 5%_{CO2}, atmosfera humidificada.

Flask Coating

Nenhum

Células U2OS-CRISPR-NUP96-mMaple | 300461

Freezing Procedure

As linhas celulares criopreservadas são expedidas em gelo seco em embalagens validadas e isoladas com refrigerante suficiente para manter aproximadamente -78 °C durante o transporte. Aquando da receção, inspecionar imediatamente o recipiente e transferir sem demora os frascos para um local de armazenamento adequado.

Shipping Conditions

As linhas celulares criopreservadas são expedidas em gelo seco em embalagens validadas e isoladas com refrigerante suficiente para manter aproximadamente -78 °C durante o transporte. Aquando da receção, inspecionar imediatamente o recipiente e transferir sem demora os frascos para um local de armazenamento adequado.

Storage Conditions

Para conservação a longo prazo, colocar os frascos em azoto líquido em fase de vapor a uma temperatura entre -150 e -196 °C. O armazenamento a -80 °C é aceitável apenas como um curto passo intermédio antes da transferência para azoto líquido.

Controlo de qualidade / Perfil genético / HLA

Sterility

A contaminação por micoplasma é excluída utilizando ensaios baseados em PCR e métodos de deteção de micoplasma baseados em luminescência.

Para garantir que não há contaminação bacteriana, fúngica ou de leveduras, as culturas de células são sujeitas a inspeções visuais diárias.