

Células U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP | 300174**Informações gerais****Description**

A U-2 OS-CRISPR-NUP96-mEGFP é uma linha celular geneticamente modificada derivada da linha-mãe do osteossarcoma humano U-2 OS. Esta linha celular incorpora uma inserção direcionada da etiqueta monomérica Enhanced Green Fluorescent Protein (mEGFP) no locus do gene NUP96, conseguida através da tecnologia de edição genética CRISPR-Cas9. O NUP96, parte do complexo do poro nuclear, é essencial para o transporte nuclear, e a sua fusão com a mEGFP permite a visualização em tempo real da dinâmica do poro nuclear sob microscopia fluorescente, fornecendo informações valiosas sobre os mecanismos de transporte nuclear e o tráfico nucleocitoplasmático.

Este clone específico, numerado 195, foi selecionado pela sua expressão estável da proteína de fusão NUP96-mEGFP e mantém as características típicas da linhagem U-2 OS, incluindo uma estrutura citoesquelética robusta que é fundamental em estudos relacionados com a migração e metástase de células cancerígenas. A aplicação da tecnologia CRISPR garante uma edição genética precisa, minimizando os efeitos fora do alvo que poderiam comprometer a integridade dos resultados experimentais. Isto torna o clone U-2 OS-CRISPR-NUP96-mEGFP n.º 195 particularmente útil para técnicas de imagiologia de alta resolução e estudos detalhados da arquitetura celular, ajudando na investigação avançada em biologia celular, investigação do cancro e fenómenos de transporte nuclear.

Organism Humano**Tissue** Osso**Disease** Osteossarcoma**Caraterísticas****Age** 15 anos**Gender** Feminino**Ethnicity** Caucasiano**Morphology** De tipo epitelial**Growth properties** Aderente**Dados regulamentares****Citation** Clone U-2 OS-CRISPR-NUP96-mEGFP n.º 195 (número de catálogo Cytion 300174)

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

GMO Status GMO-S1: Esta linha celular de osteossarcoma humano (U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP, clone 195) contém uma fusão NUP96-mEGFP com engenharia CRISPR introduzida através de entrega lentiviral, permitindo o rastreamento fluorescente de complexos de poros nucleares. A modificação está integrada de forma estável. Esta classificação aplica-se apenas na Alemanha e pode diferir noutros países.

Dados biomoleculares

Protein expression MEGFP (proteína 96 do complexo do poro nuclear, marcada com mEGFP)

Manuseamento

Culture Medium McCoys 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 NaHCO₃ (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 2 a 3 x 10⁴ células/cm²

Fluid renewal 2 a 3 vezes por semana

Células U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP | 300174

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% CO_2 , atmosfera humidificada.

Flask Coating

Nenhum

Células U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP | 300174

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 inspecções visuais diárias.