

Bunky U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP | 300174**Všeobecné informácie****Description**

U-2 OS-CRISPR-NUP96-mEGFP je geneticky modifikovaná bunková línia odvodená od materskej línie ľudského osteosarkómu U-2 OS. Táto bunková línia obsahuje cieleňú inzerciu monoméneho zosilneného zeleného fluorescenčného proteínu (mEGFP) do lokusu génu NUP96, ktorá sa dosiahla pomocou technológie úpravy génov CRISPR-Cas9. NUP96, súčasť komplexu jadrových pórov, je nevyhnutný pre jadrový transport a jeho fúzia s mEGFP umožňuje vizualizáciu dynamiky jadrových pórov v reálnom čase pod fluorescenčným mikroskopom, čo poskytuje cenné poznatky o mechanizmoch jadrového transportu a nukleocytoplazmatickej dopravy.

Tento špecifický klon s číslom 195 bol vybraný pre svoju stabilnú expresiu fúzneho proteínu NUP96-mEGFP a zachováva si typické vlastnosti línie U-2 OS vrátane robustnej cytoskeletálnej štruktúry, ktorá je rozhodujúca pri štúdiách týkajúcich sa migrácie a metastázovania rakovinových buniek. Použitie technológie CRISPR zabezpečuje presnú úpravu génov, čím sa minimalizujú necieľové účinky, ktoré by mohli ohroziť integritu experimentálnych výsledkov. Vďaka tomu je klon U-2 OS-CRISPR-NUP96-mEGFP č. 195 obzvlášť užitočný na zobrazovacie techniky s vysokým rozlíšením a podrobné štúdie bunkovej architektúry, čo napomáha pokročilému výskumu v oblasti bunkovej biológie, výskumu rakoviny a javov jadrového transportu.

Organism

Ľudské

Tissue

Kosti

Disease

Osteosarkóm

Charakteristika**Age**

15 rokov

Gender

Ženy

Ethnicity

Kaukazský

Morphology

Epitelu podobné

Growth properties

Adherent

Regulačné údaje**Citation**

U-2 OS-CRISPR-NUP96-mEGFP klon č. 195 (číslo katalógu Cytion 300174)

Biosafety level

1

Bunky U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP | 300174**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_B7FJ**Depositor** Ellenbergova laboratória (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Táto ľudská bunková línia osteosarkómu (U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP, klon 195) obsahuje fúziu NUP96-mEGFP vytvorenú pomocou CRISPR, ktorá bola zavedená prostredníctvom lentivírusového prenosu a umožňuje fluorescenčné sledovanie komplexov jadrových pórov. Modifikácia je stabilne integrovaná. Táto klasifikácia platí len v Nemecku a môže sa líšiť v iných krajinách.**Biomolekulárne údaje****Protein expression** MEGFP (proteín jadrového pórového komplexu 96, označený mEGFP)**Spracovanie****Culture Medium** McCoys 5a, w: 3,0 g/l glukóza, w: stabilný glutamín, w: 2,0 mM pyruvát sodný, w: 2,2 g/l NaHCO₃ (číslo článku Cytion 820200a)**Supplements** Doplňte médium o 10% FBS, 1% NEAA**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Odstráňte staré médium z adherovaných buniek a premyte ich PBS, ktorý neobsahuje vápnik a horčík. Pre banky T25 použite 3 - 5 ml PBS a pre banky T75 použite 5 - 10 ml. Potom bunky úplne pokryte Accutase, pričom použite 1 - 2 ml pre banky T25 a 2,5 ml pre banky T75. Nechajte bunky inkubovať pri izbovej teplote 8-10 minút, aby sa oddelili. Po inkubácii jemne premiešajte bunky s 10 ml média, aby boli znovu suspendované, a potom ich 3 minúty odstredujte pri 300xg. Supernatant zlikvidujte, bunky znovu rozmiešajte v čerstvom médiu a preneste ich do nových fliaš, ktoré už obsahujú čerstvé médium.**Seeding density** 2 až 3 x 10⁴ buniek/cm²**Fluid renewal** 2 až 3-krát týždenne**Freeze medium** Ako kryokonzervačné médium používame kompletne rastové médium (vrátane FBS) + 10 % DMSO na zabezpečenie primeranej životaschopnosti po rozmrazení alebo CM-1 (katalógové číslo 800100 spoločnosti Cytion), ktoré obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory na zlepšenie regenerácie a zníženie stresu spôsobeného kryom.

Bunky U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP | 300174**Thawing and
Culturing Cells**

1. Overte si, že injekčná liekovka zostane pri doručení hlboko zmrazená, pretože bunky sa prepravujú na suchom ľade, aby sa počas prepravy udržala optimálna teplota.
2. Po prijatí buď okamžite uskladnite kryovialku pri teplote nižšej ako -150 °C, aby ste zabezpečili zachovanie bunkovej integrity, alebo prejdite na krok 3, ak je potrebná okamžitá kultivácia.
3. V prípade okamžitej kultivácie injekčnú liekovku rýchlo rozmrazte ponorením do vodného kúpeľa s teplotou 37 °C s čistou vodou a antimikrobiálnym prostriedkom, pričom ju jemne miešajte 40 - 60 sekúnd, kým nezostane malý ľadový chumáč.
4. Všetky ďalšie kroky vykonajte v sterilných podmienkach v prietokovom digestore a pred otvorením kryovialku dezinfikujte 70 % etanolom.
5. Opatrne otvorte dezinfikovanú fľaštičku a preneste bunkovú suspenziu do 15 ml centrifugačnej skúmavky obsahujúcej 8 ml kultivačného média s izbovou teplotou a jemne premiešajte.
6. Zmes odstreďujte pri 300 x g počas 3 minút, aby sa bunky oddelili, a opatrne zlikvidujte supernatant obsahujúci zvyšky zmrazovacieho média.
7. Pelet buniek jemne resuspendujte v 10 ml čerstvého kultivačného média. V prípade adherentných buniek rozdeľte suspenziu medzi dve kultivačné banky T25; v prípade suspenzných kultúr preneste všetko médium do jednej banky T25, aby ste podporili účinnú interakciu a rast buniek.
8. Dodržiavajte zavedené subkultivačné protokoly na nepretržitý rast a udržiavanie bunkovej línie, čím sa zabezpečia spoľahlivé výsledky experimentov.

**Incubation
Atmosphere**

37 °C, 5 % CO_2 , zvlhčená atmosféra.

Flask Coating

Žiadne

**Freezing
Procedure**

Kryokonzervované bunkové línie sa prepravujú na suchom ľade v overených, izolovaných obaloch s dostatočným množstvom chladiva na udržanie teploty približne -78 °C počas celej prepravy. Po prijatí ihneď skontrolujte obal a bezodkladne premiestnite injekčné liekovky do vhodného skladu.

**Shipping
Conditions**

Kryokonzervované bunkové línie sa prepravujú na suchom ľade v overených, izolovaných obaloch s dostatočným množstvom chladiva na udržanie teploty približne -78 °C počas celej prepravy. Po prijatí ihneď skontrolujte obal a bezodkladne premiestnite injekčné liekovky do vhodného skladu.

Bunky U2OS-CRISPR-NUP96-mEGFP | 300174

Storage Conditions

Na dlhodobé uchovávanie umiestnite injekčné liekovky do kvapalnej fázy dusíka v pare pri teplote približne -150 až -196 °C. Skladovanie pri teplote -80 °C je prijateľné len ako krátky prechodný krok pred presunom do tekutého dusíka.

Kontrola kvality / Genetický profil / HLA

Sterility

Kontaminácia mykoplazmami sa vylučuje pomocou testov založených na PCR a metód detekcie mykoplazmiem založených na luminiscencii.

Aby sa zabezpečilo, že nedošlo ku kontaminácii baktériami, hubami alebo kvasinkami, bunkové kultúry sa denne vizuálne kontrolujú.