

Cellules HK-CRISPR-mEGFP-RanBP2/Nup358 | 301575**Informations générales****Description**

La lignée cellulaire HK-CRISPR-mEGFP-Nup358 est un dérivé génétiquement modifié des cellules HeLa Kyoto, connues pour leur robustesse et leur large utilisation dans la recherche scientifique. Cette lignée cellulaire a été modifiée à l'aide de la technologie CRISPR-Cas9 pour exprimer la protéine fluorescente verte améliorée monomérique (mEGFP) étiquetée Nup358, un composant crucial du complexe du pore nucléaire (NPC). Nup358, également connu sous le nom de RanBP2, joue un rôle important dans le transport nucléocytoplasmique, l'assemblage du fuseau mitotique et d'autres processus cellulaires. L'étiquette mEGFP permet de visualiser Nup358, ce qui facilite l'observation en temps réel de sa dynamique et de ses interactions au sein de la cellule.

Les cellules HeLa Kyoto, une sous-lignée des cellules HeLa originales, se caractérisent par leur adaptabilité et leur croissance stable en culture. Le système CRISPR-Cas9 de cette lignée cellulaire permet une édition génomique précise, garantissant que l'étiquette mEGFP est fusionnée avec précision à la protéine Nup358 sans perturber sa fonction. Cela fait de la lignée cellulaire HK-CRISPR-mEGFP-Nup358 un outil précieux pour l'étude des aspects structurels et fonctionnels du complexe du pore nucléaire. Les chercheurs peuvent utiliser cette lignée cellulaire pour mieux comprendre les mécanismes régissant le transport nucléocytoplasmique et le rôle de Nup358 dans l'homéostasie cellulaire et les états pathologiques, tels que le cancer et les infections virales.

Organism Humain**Tissue** Endocol**Disease** Adénocarcinome**Caractéristiques****Age** 30 ans**Gender** Femme**Ethnicity** Afro-américain**Morphology** Cellules de type épithélial avec une forme de pierre en mosaïque**Growth properties** Adhérent**Données réglementaires****Citation** HK-CRISPR-mEGFP-Nup358 (numéro de catalogue Cytion 301575)**Biosafety level** 1

Cellules HK-CRISPR-mEGFP-RanBP2/Nup358 | 301575**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_B7FS**Depositor** Le laboratoire Ellenberg (EMBL)**GMO Status** OGM-S1 : Cette lignée HeLa Kyoto contient une étiquette mEGFP intégrée par CRISPR au locus RanBP2/Nup358, permettant la visualisation des filaments cytoplasmiques du pore nucléaire. Cette classification ne s'applique qu'à l'Allemagne et peut différer dans d'autres pays.**Données biomoléculaires****Products** EGFP (protéine fluorescente verte renforcée)**Manipulation****Culture Medium** DMEM, w : 4.5 g/L Glucose, w : 4 mM L-Glutamine, w : 3.7 g/L NaHCO₃, w : 1.0 mM Pyruvate de sodium (numéro d'article Cytion 820300a)**Supplements** Compléter le milieu avec 10% de FBS**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Retirer l'ancien milieu des cellules adhérentes et les laver avec du PBS dépourvu de calcium et de magnésium. Pour les flacons T25, utiliser 3-5 ml de PBS, et pour les flacons T75, 5-10 ml. Ensuite, recouvrir complètement les cellules avec Accutase, en utilisant 1 à 2 ml pour les flacons T25 et 2,5 ml pour les flacons T75. Laisser les cellules incuber à température ambiante pendant 8-10 minutes pour les détacher. Après incubation, mélanger délicatement les cellules avec 10 ml de milieu pour les remettre en suspension, puis centrifuger à 300xg pendant 3 minutes. Jeter le surnageant, remettre les cellules en suspension dans du milieu frais et les transférer dans de nouveaux flacons contenant déjà du milieu frais.**Split ratio** Un rapport de 1:3 est recommandé**Fluid renewal** 2 à 3 fois par semaine**Freeze medium** Comme milieu de cryoconservation, nous utilisons un milieu de croissance complet (comprenant du FBS) + 10 % de DMSO pour une viabilité adéquate après décongélation, ou CM-1 (numéro de catalogue 800100 de Cytion), qui comprend des osmoprotectants et des stabilisateurs métaboliques optimisés pour améliorer la récupération et réduire le stress induit par la cryogénéisation.

Cellules HK-CRISPR-mEGFP-RanBP2/Nup358 | 301575

Thawing and Culturing Cells

1. Confirmer que le flacon est toujours congelé à la livraison, car les cellules sont expédiées sur de la glace sèche pour maintenir des températures optimales pendant le transport.
2. Dès réception, soit conserver immédiatement le cryovial à des températures inférieures à -150°C pour assurer la préservation de l'intégrité cellulaire, soit passer à l'étape 3 si une mise en culture immédiate est nécessaire.
3. Pour une mise en culture immédiate, décongeler rapidement le flacon en l'immergeant dans un bain-marie à 37°C avec de l'eau propre et un agent antimicrobien, en l'agitant doucement pendant 40 à 60 secondes jusqu'à ce qu'il ne reste qu'un petit amas de glace.
4. Effectuer toutes les étapes suivantes dans des conditions stériles sous une hotte à flux, en désinfectant le cryovial avec de l'éthanol à 70 % avant de l'ouvrir.
5. Ouvrir soigneusement le flacon désinfecté et transférer la suspension cellulaire dans un tube à centrifuger de 15 ml contenant 8 ml de milieu de culture à température ambiante, en mélangeant doucement.
6. Centrifuger le mélange à 300 x g pendant 3 minutes pour séparer les cellules et jeter soigneusement le surnageant contenant le milieu de congélation résiduel.
7. Remettre doucement en suspension le culot cellulaire dans 10 ml de milieu de culture frais. Pour les cellules adhérentes, répartir la suspension entre deux flacons de culture T25 ; pour les cultures en suspension, transférer tout le milieu dans un seul flacon T25 afin de favoriser une interaction et une croissance efficaces des cellules.
8. Respecter les protocoles de sous-culture établis pour une croissance et un entretien continus de la lignée cellulaire, garantissant ainsi des résultats expérimentaux fiables.

Incubation Atmosphere

37°C, 5%_{CO2}, atmosphère humidifiée.

Flask Coating

Pour une fixation et une viabilité optimales après décongélation, nous recommandons d'utiliser des **flacons ou des plaques recouverts de collagène**.

Freezing Procedure

Les lignées cellulaires cryoconservées sont expédiées sur glace sèche dans des emballages isolés et validés, avec suffisamment de réfrigérant pour maintenir une température d'environ -78 °C tout au long du transport. À la réception, inspecter immédiatement le conteneur et transférer sans délai les flacons dans un lieu de stockage approprié.

Cellules HK-CRISPR-mEGFP-RanBP2/Nup358 | 301575

Shipping Conditions

Les lignées cellulaires cryoconservées sont expédiées sur glace sèche dans des emballages isolés et validés, avec suffisamment de réfrigérant pour maintenir une température d'environ -78 °C tout au long du transport. À la réception, inspecter immédiatement le conteneur et transférer sans délai les flacons dans un lieu de stockage approprié.

Storage Conditions

Pour une conservation à long terme, placer les flacons dans de l'azote liquide en phase vapeur à une température comprise entre -150 et -196 °C environ. Le stockage à -80 °C n'est acceptable qu'en tant qu'étape intermédiaire de courte durée avant le transfert dans l'azote liquide.

Contrôle de qualité / Profil génétique / HLA

Sterility

La contamination par les mycoplasmes est exclue à l'aide de tests basés sur la PCR et de méthodes de détection des mycoplasmes basées sur la luminescence.

Pour s'assurer de l'absence de contamination bactérienne, fongique ou levurienne, les cultures cellulaires font l'objet d'inspections visuelles quotidiennes.