

**Cellules HK EGFP-alpha-tubuline/H2B-mCherry | 300670****Informations générales****Description**

La lignée cellulaire HK EGFP-alpha-tubuline/H2B-mCherry HeLa Kyoto est un modèle méticuleusement conçu pour la visualisation détaillée des processus cellulaires. Cette lignée clonale a été transfectée de manière stable pour exprimer deux fusions de protéines fluorescentes qui permettent l'imagerie en temps réel de la chromatine et du réseau microtubulaire. La protéine fluorescente rouge mCherry est fusionnée à la protéine H2B de l'histone centrale, créant ainsi H2B-mCherry. Cette protéine de fusion est exprimée à partir du plasmide pH2B-mCherry-IRES-neo3 et sert de marqueur de chromatine, mettant en évidence l'ADN nucléaire dans l'imagerie des cellules vivantes et facilitant les études sur la dynamique de la chromatine et l'architecture nucléaire.

En outre, cette lignée cellulaire exprime la GFP (Green Fluorescent Protein) renforcée monomérique fusionnée à l' $\alpha$ -tubuline, introduite via le plasmide pmEGFP- $\alpha$ -tubuline-IRES-puro2b. La fusion GFP- $\alpha$ -tubuline produit une fluorescence verte vive qui met en évidence les structures des microtubules dans la cellule. Cette caractéristique est cruciale pour l'étude de l'organisation et de la dynamique des microtubules et de leur rôle dans la division cellulaire et le transport intracellulaire. L'intégration stable de ces constructions permet une observation continue et à long terme de ces composants cellulaires sans qu'il soit nécessaire de procéder à des transfections répétées, ce qui réduit la variabilité et accroît la fiabilité des résultats expérimentaux. La sélection de la résistance aux médicaments après la transfection assure la stabilité et l'uniformité de l'expression parmi les cellules de cette lignée.

**Organism**

Humain

**Tissue**

Col de l'utérus

**Disease**

Carcinome

**Synonyms**

HeLa Kyoto EGFP-a-tubuline/H2B-mCherry, HeLa H2B-mRFP et mEGFP-alpha-tubuline

**Caractéristiques****Age**

30 ans

**Gender**

Femme

**Ethnicity**

Afro-américain

**Morphology**

Cellules de type épithélial avec une forme de pierre en mosaïque

**Growth properties**

Monocouche, adhérente

**Données réglementaires**

## Cellules HK EGFP-alpha-tubuline/H2B-mCherry | 300670

<b>Citation</b>	HK EGFP-alpha-tubuline/H2B-mCherry (numéro de catalogue Cytion 300670)
<b>Biosafety level</b>	1
<b>NCBI_TaxID</b>	9606
<b>CellosaurusAccession</b>	CVCL_L802
<b>Depositor</b>	Le laboratoire Ellenberg (EMBL)
<b>GMO Status</b>	GMO-S1 : cette lignée HeLa Kyoto contient des constructions EGFP- $\alpha$ -tubuline et H2B-mCherry pour l'imagerie simultanée des microtubules et de la chromatine. Cette classification s'applique uniquement en Allemagne et peut différer ailleurs.

## Données biomoléculaires

<b>Protein expression</b>	EGFP-alpha-tubuline, H2B-mCherry : Localisation/Gène : 1..589 / Pcmv, 652..1029 H2B, 1042..1752 / mCherry, 2983..3777 / KanR/NeoR
<b>Viruses</b>	Négatif pour le VIH, le VHB et le VHC.
<b>Products</b>	Promoteur CMV, Histone H2B, Néomycine, Phosphotransférase

## Manipulation

<b>Culture Medium</b>	DMEM, w : 4.5 g/L Glucose, w : 4 mM L-Glutamine, w : 3.7 g/L NaHCO <sub>3</sub> , w : 1.0 mM Pyruvate de sodium (numéro d'article Cytion 820300a)
<b>Supplements</b>	Compléter le milieu avec 10% de FBS
<b>Dissociation Reagent</b>	Accutase
<b>Doubling time</b>	24 heures
<b>Subculturing</b>	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.

## Cellules HK EGFP-alpha-tubuline/H2B-mCherry | 300670

---

**Split ratio** Un rapport de 1:3 est recommandé

**Seeding density**  $1 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>

**Fluid renewal** 2 à 3 fois par semaine

**Post-Thaw Recovery** Après décongélation, ensemercer les cellules à raison de  $5 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> et laisser les cellules se remettre du processus de congélation et adhérer pendant au moins 24 heures.

**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 EGFP-alpha-tubuline/H2B-mCherry | 300670

### 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 continu de la lignée cellulaire, garantissant ainsi des résultats expérimentaux fiables.

### Incubation Atmosphere

37°C, 5% CO<sub>2</sub>, atmosphère humidifiée.

### Flask Coating

Aucun

### 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 EGFP-alpha-tubuline/H2B-mCherry | 300670

### 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.