

Cellules HK-CRISPR-mEGFP-RanBP2/Nup358 | 301575**Renseignements généraux****Description**

La lignée cellulaire HK-CRISPR-mEGFP-Nup358 est un dérivé génétiquement modifié des cellules HeLa Kyoto, réputées pour leur robustesse et leur utilisation généralisée dans la recherche scientifique. Cette lignée cellulaire a été modifiée à l'aide de la technologie CRISPR-Cas9 afin d'exprimer la protéine Nup358 marquée par la mEGFP (protéine fluorescente verte améliorée monomérique), un composant essentiel du complexe des pores nucléaires (NPC). La protéine Nup358, également connue sous le nom de RanBP2, joue un rôle important dans le transport nucléocytoplasmique, l'assemblage du fuseau mitotique et d'autres processus cellulaires. Le marqueur mEGFP permet de visualiser la protéine Nup358, facilitant ainsi 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 utilisé dans cette lignée cellulaire permet une modification génomique précise, garantissant que le marqueur mEGFP est correctement fusionné à la protéine Nup358 sans en perturber la fonction. Cela fait de la lignée cellulaire HK-CRISPR-mEGFP-Nup358 un outil précieux pour l'étude des aspects structurels et fonctionnels du complexe des pores nucléaires. Les chercheurs peuvent utiliser cette lignée cellulaire pour mieux comprendre les mécanismes régissant le transport nucléocytoplasmique ainsi que le rôle de Nup358 dans l'homéostasie cellulaire et dans des états pathologiques, tels que le cancer et les infections virales.

Organism Humain**Tissue** Endocervix**Disease** Adénocarcinome**Caractéristiques****Age** 30 ans**Gender** Femme**Ethnicity** Afro-Américain**Morphology** Cellules de type épithélial présentant une forme de pierre en mosaïque**Growth properties** Adeptes**Données réglementaires****Citation** HK-CRISPR-mEGFP-Nup358 (numéro de catalogue Cytion 301575)

Cellules HK-CRISPR-mEGFP-RanBP2/Nup358 | 301575**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_B7FS**Depositor** Le laboratoire Ellenberg (EMBL)**GMO Status** GMO-S1 : Cette lignée HeLa Kyoto contient un marqueur mEGFP intégré par CRISPR au locus RanBP2/Nup358, ce qui permet de visualiser les filaments cytoplasmiques du pore nucléaire. Cette classification ne s'applique qu'en Allemagne et peut varier ailleurs.**Données biomoléculaires****Products** EGFP (protéine fluorescente verte améliorée)**Manipulation****Culture Medium** DMEM, p/v : 4,5 g/L de glucose, p/v : 4 mM de L-glutamine, p/v : 3,7 g/L de NaHCO₃, p/v : 1,0 mM de pyruvate de sodium (référence Cytion 820300a)**Supplements** Ajouter 10 % de FBS au milieu de culture**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Retirez l'ancien milieu des cellules adhérentes et lavez-les avec du PBS sans calcium ni magnésium. Pour les flacons T25, utilisez 3 à 5 ml de PBS, et pour les flacons T75, utilisez 5 à 10 ml. Ensuite, recouvrez complètement les cellules d'Accutase, en utilisant 1 à 2 ml pour les flacons T25 et 2,5 ml pour les flacons T75. Laissez les cellules incuber à température ambiante pendant 8 à 10 minutes afin de les détacher. Après l'incubation, mélangez délicatement les cellules avec 10 ml de milieu pour les remettre en suspension, puis centrifugez à 300 x g pendant 3 minutes. Éliminez le surnageant, remettez les cellules en suspension dans du milieu frais, puis transférez-les dans de nouveaux flacons contenant déjà du milieu frais.**Fluid renewal** 2 à 3 fois par semaine**Freeze medium** Comme milieu de cryoconservation, nous utilisons un milieu de croissance complet (contenant du sérum foetal bovin) + 10 % de DMSO pour assurer une viabilité adéquate après décongélation, ou du CM-1 (référence Cytion 800100), qui contient des osmoprotecteurs et des stabilisateurs métaboliques optimisés pour améliorer la récupération et réduire le stress induit par la cryoconservation.

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

Thawing and Culturing Cells

1. Assurez-vous que le flacon reste bien congelé à la livraison, car les cellules sont expédiées sur de la glace sèche afin de maintenir des températures optimales pendant le transport.
2. À la réception, conservez immédiatement le cryofiole à une température inférieure à -150 °C pour garantir la préservation de l'intégrité cellulaire, ou passez à l'étape 3 si une culture immédiate est nécessaire.
3. Pour une culture immédiate, décongelez rapidement le flacon en l'immergeant dans un bain-marie à 37 °C contenant de l'eau propre et un agent antimicrobien, en agitant doucement pendant 40 à 60 secondes jusqu'à ce qu'il ne reste qu'un petit morceau de glace.
4. Effectuez toutes les étapes suivantes dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire, en désinfectant le cryotube avec de l'éthanol à 70 % avant de l'ouvrir.
5. Ouvrez avec précaution le flacon désinfecté et transférez la suspension cellulaire dans un tube à centrifuger de 15 ml contenant 8 ml de milieu de culture à température ambiante, en mélangeant délicatement.
6. Centrifuger le mélange à 300 x g pendant 3 minutes pour séparer les cellules, puis jeter avec précaution le surnageant contenant le milieu de congélation résiduel.
7. Remettre délicatement le culot cellulaire en suspension dans 10 ml de milieu de culture frais. Pour les cellules adhérentes, répartir la suspension dans deux flacons de culture T25; pour les cultures en suspension, transférer la totalité du milieu dans un seul flacon T25 afin de favoriser une interaction et une croissance cellulaires efficaces.
8. Respectez les protocoles de sous-culture établis pour assurer la croissance continue et le maintien de la lignée cellulaire, garantissant ainsi des résultats expérimentaux fiables.

Incubation Atmosphere

37 °C, 5 % de CO₂, atmosphère humidifiée.

Shipping Conditions

Les lignées cellulaires cryoconservées sont expédiées dans de la glace sèche, dans un emballage isotherme validé contenant suffisamment de réfrigérant pour maintenir une température d'environ -78 °C pendant tout le transport. À la réception, inspectez immédiatement le conteneur et transférez sans délai les flacons dans un lieu de stockage approprié.

Storage Conditions

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

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

Contrôle de la qualité et analyse moléculaire

Sterility

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

Afin de s'assurer qu'il n'y a aucune contamination bactérienne, fongique ou par des levures, les cultures cellulaires font l'objet d'inspections visuelles quotidiennes.