

HK Mad2-LAP/H2B-mCherry buňky | 300920

Obecné informace

Description

Buněčná linie HK Mad2-LAP/H2B-mCherry je geneticky upravený buněčný model hojně využívaný ke studiu segregace chromozomů a kontrolního bodu sestavení vřeténka během mitózy. Tyto buňky jsou odvozeny z buněk HeLa Kyoto, robustní lidské buněčné linie původně odebrané z karcinomu děložního hrdla. Aspekt buněčné linie HK Mad2-LAP (Mad2 značený LAP) usnadňuje vizualizaci a funkční analýzu proteinu Mad2, kritické součásti kontrolního bodu sestavení vřeténka, který brání nástupu anafáze, dokud nejsou všechny chromozomy správně zarovnány na metafázní destičce.

Inkorporace H2B-mCherry, kdy je histon H2B označen fluorescenčním proteinem mCherry, umožňuje zobrazovat dynamiku chromatinu v reálném čase během buněčného dělení. Díky této vlastnosti je buněčná linie HK Mad2-LAP/H2B-mCherry vynikajícím nástrojem pro zobrazovací techniky s vysokým rozlišením v živých buňkách, které umožňují pozorovat pohyby chromozomů a mitotický vývoj v lidských buňkách za různých experimentálních podmínek. Použití fluorescenčních značek napomáhá přesnému sledování a kvantifikaci, čímž poskytuje cenné poznatky o molekulárních mechanismech regulujících buněčný cyklus a stabilitu chromozomů.

Organism Člověk

Tissue Cervix

Disease Karcinom

Synonyms HeLa Kyoto Mad2-LAP a H2B-mCherry, HeLa Kyoto Mad2-LAP

Charakteristika

Age 30 let

Gender Ženy

Ethnicity Afroameričan

Morphology Buňky podobné epitelu s mozaikovitým tvarem kamínků

Growth properties Monovrstva, adherentní

Regulační údaje

Citation HK Mad2-LAP/H2B-mCherry (katalogové číslo Cytion 300920)

Biosafety level 1

HK Mad2-LAP/H2B-mCherry buňky | 300920

NCBI_TaxID 9606**CellosaurusAccession** CVCL_1D65**Depositor** Ellenbergova laboratoř (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Tato linie HeLa Kyoto obsahuje konstrukty Mad2-LAP a H2B-mCherry, které umožňují vizualizaci dynamiky kontrolního bodu vřetena. Tato klasifikace platí pouze v Německu a jinde se může lišit.

Biomolekulární data

Protein expression Mad2-LAP/H2B-mCherry

Zpracování

Culture Medium DMEM, w: 4,5 g/l glukózy, w: 4 mM L-glutaminu, w: 3,7 g/l NaHCO₃, w: 1,0 mM pyruvátu sodného (číslo výrobku Cytion 820300a)**Supplements** Doplněte médium o 10% FBS**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Odstraňte staré médium z adherovaných buněk a promyjte je PBS bez vápníku a hořčíku. Pro baňky T25 použijte 3-5 ml PBS a pro baňky T75 5-10 ml. Poté buňky zcela zakryjte přípravkem Accutase, přičemž použijte 1-2 ml pro baňky T25 a 2,5 ml pro baňky T75. Nechte buňky inkubovat při pokojové teplotě po dobu 8-10 minut, aby se oddělily. Po inkubaci jemně promíchejte buňky s 10 ml média, aby byly znovu suspendovány, a poté je odstředte při 300xg po dobu 3 minut. Supernatant vyhodte, buňky znovu rozpusťte v čerstvém médiu a přeneste je do nových baněk, které již obsahují čerstvé médium.**Split ratio** Doporučuje se poměr 1:3**Seeding density** 1×10^4 buněk/cm²**Fluid renewal** 2 až 3krát týdně**Post-Thaw Recovery** Po rozmrazení naneste buňky v množství 5×10^4 buněk/cm² a nechte je alespoň 24 hodin zotavit se z procesu zmrazení a přilnout.

HK Mad2-LAP/H2B-mCherry buňky | 300920**Freeze medium**

Jako kryokonzervační médium používáme kompletní růstové médium (včetně FBS) + 10 % DMSO pro zajištění dostatečné životaschopnosti po rozmrazení nebo CM-1 (katalogové číslo 800100 společnosti Cytion), které obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory pro zlepšení regenerace a snížení stresu způsobeného kryo.

Thawing and Culturing Cells

1. Ověřte si, že lahvička zůstane při dodání hluboce zmrazená, protože buňky se přepravují na suchém ledu, aby se během přepravy udržely optimální teploty.
2. Po obdržení kryovialku buď okamžitě uložte při teplotě nižší než -150 °C, abyste zajistili zachování buněčné integrity, nebo přejděte ke kroku 3, pokud je nutná okamžitá kultivace.
3. Pro okamžitou kultivaci rychle rozmrazte lahvičku ponořením do vodní lázně o teplotě 37 °C s čistou vodou a antimikrobiálním prostředkem a jemně ji míchejte po dobu 40-60 sekund, dokud nezůstane malý ledový chuchvalec.
4. Všechny další kroky provádějte za sterilních podmínek v průtokové digestoři a před otevřením kryovialku dezinfikujte 70% ethanolem.
5. Opatrně otevřete dezinfikovanou lahvičku a přeneste buněčnou suspenzi do 15 ml centrifugační zkušavky obsahující 8 ml kultivačního média o pokojové teplotě a jemně promíchejte.
6. Směs odstředujte při 300 x g po dobu 3 minut, aby se buňky oddělily, a supernatant obsahující zbytky mrazicího média opatrně zlikvidujte.
7. Pelety buněk jemně resuspendujte v 10 ml čerstvého kultivačního média. U adherentních buněk rozdělte suspenzi mezi dvě kultivační baňky T25; u suspenzních kultur přeneste veškeré médium do jedné baňky T25, abyste podpořili účinnou interakci a růst buněk.
8. Dodržujte zavedené subkultivační protokoly pro kontinuální růst a udržování buněčné linie, čímž zajistíte spolehlivé výsledky experimentů.

Incubation Atmosphere

37 °C, 5 % CO_2 , zvlhčená atmosféra.

Flask Coating

Žádný

Freezing Procedure

Kryokonzervované buněčné linie se přepravují na suchém ledu v ověřených, izolovaných obalech s dostatečným množstvím chladiva, aby se po celou dobu přepravy udržovala teplota přibližně -78 °C. Po obdržení ihned zkontrolujte obal a neprodleně přeneste lahvičky do vhodného skladu.

HK Mad2-LAP/H2B-mCherry buňky | 300920

Shipping Conditions

Kryokonzervované buněčné linie se přepravují na suchém ledu v ověřených, izolovaných obalech s dostatečným množstvím chladiva, aby se po celou dobu přepravy udržovala teplota přibližně -78 °C. Po obdržení ihned zkontrolujte obal a neprodleně přeneste lahvičky do vhodného skladu.

Storage Conditions

Pro dlouhodobé uchování umístěte lahvičky do kapalného dusíku v plynné fázi při teplotě přibližně -150 až -196 °C. Skladování při -80 °C je přijatelné pouze jako krátký přechodný krok před přemístěním do kapalného dusíku.

Kontrola kvality / Genetický profil / HLA

Sterility

Kontaminace mykoplazmaty je vyloučena jak pomocí testů založených na PCR, tak pomocí luminiscenčních metod detekce mykoplazmy.

Aby se zajistilo, že nedojde ke kontaminaci bakteriemi, plísněmi nebo kvasinkami, jsou buněčné kultury denně podrobovány vizuálním kontrolám.