

Κύτταρα HK EGFP-alpha-tubulin/H2B-mCherry | 300670

Γενικές πληροφορίες

Description

Η κυτταρική σειρά HK EGFP-alpha-tubulin/H2B-mCherry HeLa Kyoto είναι ένα σχολαστικά κατασκευασμένο μοντέλο που έχει σχεδιαστεί για λεπτομερή απεικόνιση των κυτταρικών διεργασιών. Αυτή η κλωνική σειρά έχει διαμολυνθεί σταθερά για να εκφράσει δύο συγχωνεύσεις φθορίζουσας πρωτεΐνης που επιτρέπουν την απεικόνιση σε πραγματικό χρόνο τόσο της χρωματίνης όσο και του μικροσωληναριακού δικτύου. Η κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry είναι συγχωνευμένη με την κεντρική πρωτεΐνη ιστονών H2B, δημιουργώντας την H2B-mCherry. Αυτή η πρωτεΐνη σύντηξης εκφράζεται από το πλασμίδιο pH2B-mCherry-IRES-neo3 και χρησιμεύει ως δείκτης χρωματίνης, αναδεικνύοντας το πυρηνικό DNA στην απεικόνιση ζωντανών κυττάρων και διευκολύνοντας μελέτες σχετικά με τη δυναμική της χρωματίνης και την πυρηνική αρχιτεκτονική.

Επιπλέον, η εν λόγω κυτταρική σειρά εκφράζει μονομερή ενισχυμένη GFP (πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη) συγχωνευμένη με α-τουμπουλίνη, η οποία εισάγεται μέσω του πλασμιδίου pmEGFP-α-tubulin-IRES-puro2b. Η σύντηξη GFP-α-τουμπουλίνης παρέχει έναν έντονο πράσινο φθορισμό που περιγράφει τις δομές των μικροσωληνίσκων εντός του κυττάρου. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι ζωτικής σημασίας για τη μελέτη της οργάνωσης και της δυναμικής των μικροσωληνίσκων και του ρόλου τους στην κυτταρική διαίρεση και την ενδοκυτταρική μεταφορά. Η σταθερή ενσωμάτωση αυτών των κατασκευών επιτρέπει τη συνεχή, μακροχρόνια παρατήρηση αυτών των κυτταρικών συστατικών χωρίς την ανάγκη επαναλαμβανόμενης διαμόλυνσης, μειώνοντας έτσι τη μεταβλητότητα και ενισχύοντας την αξιοπιστία των πειραματικών αποτελεσμάτων. Η επιλογή ανθεκτικότητας στα φάρμακα μετά τη διαμόλυνση εξασφαλίζει τη σταθερότητα και την ομοιομορφία της έκφρασης μεταξύ των κυττάρων αυτής της σειράς.

Organism

Ανθρώπινο

Tissue

Τράχηλος μήτρας

Disease

Καρκίνωμα

Synonyms

HeLa Kyoto EGFP-a-tubulin/H2B-mCherry, HeLa H2B-mRFP και mEGFP-alpha-tubulin

Χαρακτηριστικά

Age

30 χρόνια

Gender

Γυναίκα

Ethnicity

Αφροαμερικανός

Morphology

Επιθηλιακά κύτταρα με ψηφιδωτό σχήμα πέτρας

Growth properties

Μονοστρωματική, προσκολλημένη

Κύτταρα HK EGFP-alpha-tubulin/H2B-mCherry | 300670

Ρυθμιστικά δεδομένα

Citation	HK EGFP-alpha-tubulin/H2B-mCherry (αριθμός καταλόγου Cytion 300670)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_L802
Depositor	Εργαστήριο Ellenberg (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Αυτή η σειρά HeLa Kyoto περιέχει κατασκευάσματα EGFP-α-tubulin και H2B-mCherry για ταυτόχρονη απεικόνιση μικροσωληνίων και χρωματίνης. Αυτή η ταξινόμηση ισχύει μόνο εντός της Γερμανίας και ενδέχεται να διαφέρει σε άλλες χώρες.

Βιομοριακά δεδομένα

Protein expression	EGFP-άλφα-τουμπουλίνη, H2B-mCherry: 589 / Pcmv, 652..1029 H2B, 1042..1752 / mCherry, 2983..3777 / KanR/NeoR
Viruses	Αρνητική για HIV, HBV και HCV.
Products	CMV Promotor, ιστόνη H2B, νεομυκίνη, φωσφοτρανσφεράση

Χειρισμός

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/L γλυκόζη, w: 4 mM L-γλουταμίνη, w: 3,7 g/L NaHCO ₃ , w: 1,0 mM πυρουβικό νάτριο (αριθμός άρθρου Cytion 820300a)
Supplements	Συμπληρώστε το μέσο με 10% FBS
Dissociation Reagent	Accutase
Doubling time	24 ώρες

Κύτταρα HK EGFP-alpha-tubulin/H2B-mCherry | 300670

Subculturing Αφαιρέστε το παλιό μέσο από τα προσκολλημένα κύτταρα και πλύντε τα με PBS που δεν περιέχει ασβέστιο και μαγνήσιο. Για φιάλες T25, χρησιμοποιήστε 3-5 ml PBS και για φιάλες T75, χρησιμοποιήστε 5-10 ml. Στη συνέχεια, καλύψτε πλήρως τα κύτταρα με Accutase, χρησιμοποιώντας 1-2 ml για φιάλες T25 και 2,5 ml για φιάλες T75. Αφήστε τα κύτταρα να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου για 8-10 λεπτά για να αποκολληθούν. Μετά την επώαση, αναμείξτε απαλά τα κύτταρα με 10 ml μέσου για να ανασυσταθούν και, στη συνέχεια, φυγοκεντρίστε στα 300xg για 3 λεπτά. Απορρίψτε το υπερκείμενο υγρό, ανασυστάστε τα κύτταρα σε φρέσκο μέσο και μεταφέρετέ τα σε νέες φιάλες που περιέχουν ήδη φρέσκο μέσο.

Seeding density 1×10^4 κύτταρα/cm²

Fluid renewal 2 έως 3 φορές την εβδομάδα

Post-Thaw Recovery Μετά την απόψυξη, τοποθετήστε τα κύτταρα σε πλάκα με πυκνότητα 5×10^4 κύτταρα/cm² και αφήστε τα κύτταρα να αναρρώσουν από τη διαδικασία κατάψυξης και να προσκολληθούν για τουλάχιστον 24 ώρες.

Freeze medium Ως μέσο κρυοσυντήρησης, χρησιμοποιούμε πλήρες μέσο ανάπτυξης (συμπεριλαμβανομένου του FBS) + 10% DMSO για επαρκή βιωσιμότητα μετά την απόψυξη, ή CM-1 (αριθμός καταλόγου Cytion 800100), το οποίο περιλαμβάνει βελτιστοποιημένα ωσμοπροστατευτικά και μεταβολικούς σταθεροποιητές για την ενίσχυση της ανάκαμψης και τη μείωση του στρες που προκαλείται από την κρυοσυντήρηση.

Κύτταρα HK EGFP-alpha-tubulin/H2B-mCherry | 300670**Thawing and
Culturing Cells**

1. Επιβεβαιώστε ότι το φιαλίδιο παραμένει βαθιά παγωμένο κατά την παράδοση, καθώς τα κύτταρα αποστέλλονται σε ξηρό πάγο για να διατηρούνται οι βέλτιστες θερμοκρασίες κατά τη μεταφορά.
2. Κατά την παραλαβή, είτε αποθηκεύστε το κρουφιαλίδιο αμέσως σε θερμοκρασίες κάτω των -150°C για να διασφαλίσετε τη διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας, είτε προχωρήστε στο βήμα 3 εάν απαιτείται άμεση καλλιέργεια.
3. Για άμεση καλλιέργεια, αποψύξτε γρήγορα το φιαλίδιο βυθίζοντάς το σε υδατόλουτρο 37°C με καθαρό νερό και αντιμικροβιακό παράγοντα, αναδεύοντας απαλά για 40-60 δευτερόλεπτα μέχρι να παραμείνει ένα μικρό σβόλο πάγου.
4. Εκτελέστε όλα τα επόμενα βήματα υπό αποστειρωμένες συνθήκες σε απορροφητήρα ροής, απολυμαίνοντας το κρουφιαλίδιο με 70% αιθανόλη πριν από το άνοιγμα.
5. Ανοίξτε προσεκτικά το απολυμασμένο φιαλίδιο και μεταφέρετε το εναιώρημα των κυττάρων σε ένα σωληνάριο φυγοκέντρησης των 15 ml που περιέχει 8 ml θρεπτικού μέσου καλλιέργειας σε θερμοκρασία δωματίου, αναμειγνύοντας απαλά.
6. Φυγοκεντρίστε το μείγμα στα 300 x g για 3 λεπτά για να διαχωριστούν τα κύτταρα και απορρίψτε προσεκτικά το υπερκείμενο που περιέχει το υπόλοιπο μέσο κατάψυξης.
7. Επανασυσσωματώστε απαλά το κυτταρικό σφαιρίδιο σε 10 ml φρέσκου μέσου καλλιέργειας. Για προσκολλημένα κύτταρα, μοιράστε το εναιώρημα σε δύο φιάλες καλλιέργειας T25- για καλλιέργειες εναιωρήματος, μεταφέρετε όλο το μέσο σε μία φιάλη T25 για να προωθήσετε την αποτελεσματική αλληλεπίδραση και ανάπτυξη των κυττάρων.
8. Τηρείτε τα καθιερωμένα πρωτόκολλα υποκαλλιέργειας για τη συνεχή ανάπτυξη και διατήρηση της κυτταρικής σειράς, εξασφαλίζοντας αξιόπιστα πειραματικά αποτελέσματα.

**Incubation
Atmosphere**

37°C , 5% CO_2 , υγραποιημένη ατμόσφαιρα.

Flask Coating

Κανένα

**Freezing
Procedure**

Οι κρουσυντηρημένες κυτταρικές σειρές αποστέλλονται σε ξηρό πάγο σε επικυρωμένη, μονωμένη συσκευασία με επαρκές ψυκτικό μέσο για τη διατήρηση περίπου των -78°C καθ' όλη τη διάρκεια της μεταφοράς. Κατά την παραλαβή, επιθεωρήστε αμέσως τον περιέκτη και μεταφέρετε τα φιαλίδια χωρίς καθυστέρηση στην κατάλληλη αποθήκη.

Κύτταρα HK EGFP-alpha-tubulin/H2B-mCherry | 300670

Shipping Conditions

Οι κρυοσυντηρημένες κυτταρικές σειρές αποστέλλονται σε ξηρό πάγο σε επικυρωμένη, μονωμένη συσκευασία με επαρκές ψυκτικό μέσο για τη διατήρηση περίπου των -78°C καθ' όλη τη διάρκεια της μεταφοράς. Κατά την παραλαβή, επιθεωρήστε αμέσως τον περιέκτη και μεταφέρετε τα φιαλίδια χωρίς καθυστέρηση στην κατάλληλη αποθήκη.

Storage Conditions

Για μακροχρόνια συντήρηση, τοποθετήστε τα φιαλίδια σε υγρό άζωτο σε φάση ατμών σε θερμοκρασία περίπου -150 έως -196°C . Η αποθήκευση στους -80°C είναι αποδεκτή μόνο ως σύντομο ενδιάμεσο βήμα πριν από τη μεταφορά σε υγρό άζωτο.

Ποιοτικός έλεγχος / Γενετικό προφίλ / HLA

Sterility

Η μόλυνση από μυκόπλασμα αποκλείεται με τη χρήση τόσο των δοκιμασιών που βασίζονται στην PCR όσο και των μεθόδων ανίχνευσης μυκοπλάσματος με βάση τη φωταύγεια.

Για να διασφαλιστεί ότι δεν υπάρχει μόλυνση από βακτήρια, μύκητες ή ζύμες, οι κυτταροκαλλιέργειες υποβάλλονται σε καθημερινές οπτικές επιθεωρήσεις.