

HK EGFP-alfa-tubuliin/H2B-mCherry rakud | 300670

Üldine teave

Description

HK EGFP-alfa-tubuliin/H2B-mCherry HeLa Kyoto rakuliin on hoolikalt loodud mudel, mis on loodud rakuprotsesside üksikasjalikuks visualiseerimiseks. See klooniline liin on stabiilselt transfekteeritud kahe fluorestseeruva valgu fusiooni ekspresseerimiseks, mis võimaldavad nii kromatiini kui ka mikrotubulaarvõrgustiku reaalajas pildistamist. Punane fluorestseeruv valk mCherry on fundeeritud histooni tuumvalguga H2B, luues H2B-mCherry. See fusioonivalk ekspresseeritakse pH2B-mCherry-IRES-neo3-plasmiidist ja see toimib kromatiini markerina, mis toob elusraku kujutamisel esile tuuma-DNA ja hõlbustab kromatiini dünaamika ja tuumaarhitektuuri uuringuid.

Lisaks ekspresseerib see rakuliin monomeerilist tugevdatud GFP-d (roheline fluorestseeruv valk), mis on fundeeritud α -tubuliiniga, mis on sisestatud pmEGFP- α -tubuliin-IRES-puro2b plasmiidi kaudu. GFP- α -tubuliini fusioon annab erksat rohelist fluorestsentsi, mis joonistab välja raku mikrotuubulite struktuurid. See omadus on oluline mikrotuubulite korralduse, dünaamika ja nende rolli uurimiseks raku jagunemisel ja rakusiseses transpordis. Nende konstruktsioonide stabiilne integreerimine võimaldab nende rakukomponentide pidevat ja pikaajalist jälgimist ilma korduva transfektsiooni vajaduseta, vähendades seeläbi varieeruvust ja suurendades katsetulemuste usaldusväärsust. Ravimiresistentsuse valimine pärast transfektsiooni tagab selle liini rakkude stabiilsuse ja ühtlase ekspressiooni.

Organism

Inimene

Tissue

Emakakael

Disease

Kartsinoom

Synonyms

HeLa Kyoto EGFP- α -tubuliin/H2B-mCherry, HeLa H2B-mRFP ja mEGFP-alfa-tubuliin

Omadused

Age

30 aastat

Gender

Naised

Ethnicity

Afroameeriklane

Morphology

Epiteelilaadsed rakud, millel on mosaiikne kivikuju

Growth properties

Monokihiline, kleepuv

Regulatiivsed andmed

HK EGFP-alfa-tubuliin/H2B-mCherry rakud | 300670

Citation	HK EGFP-alfa-tubuliin/H2B-mCherry (Cytioni katalooginumber 300670)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_L802
Depositor	Ellenbergi labor (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: See HeLa Kyoto liin sisaldab EGFP- α -tubuliini ja H2B-mCherry konstruktsioone mikrotubulite ja kromatiini samaaegseks kujutamiseks. See klassifikatsioon kehtib ainult Saksamaal ja võib mujal erineda.

Biomolekulaarsed andmed

Protein expression	EGFP-alfa-tubuliin, H2B-mCherry: Asukoht/geen: 1..589 / Pcmv, 652..1029 H2B, 1042..1752 / mCherry, 2983..3777 / KanR/NeoR
Viruses	HIV, HBV ja HCV suhtes negatiivne.
Products	CMV Promotor, histoon H2B, neomütsiin, fosfotransferaas

Töötlemine

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/L glükoosi, w: 4 mM L-glutamiini, w: 3,7 g/L NaHCO ₃ , w: 1,0 mM naatriumpüruvaati (Cytioni artikli number 820300a)
Supplements	Täiendada söötme 10% FBS-ga
Dissociation Reagent	Accutase
Doubling time	24 tundi
Subculturing	Eemaldage kleepunud rakkudelt vana söötme ja peske neid PBS-ga, milles puudub kaltsium ja magneesium. T25 kolbide puhul kasutage 3-5 ml PBS-i ja T75 kolbide puhul 5-10 ml. Seejärel katke rakud täielikult Accutase'iga, kasutades 1-2 ml T25 kolbide puhul ja 2,5 ml T75 kolbide puhul. Laske rakkudel inkubeerida 8-10 minutit toatemperatuuril, et need eralduksid. Pärast inkubeerimist segage rakud ettevaatlikult 10 ml söötmega, et neid resuspenseerida, seejärel tsentrifugeerige 3 minutit 300xg juures. Visake supernatant ära, suspenseerige rakud uuesti värskes keskkonnas ja viige need uutesse kolvidesse, mis sisaldavad juba värsket keskkonda.

HK EGFP-alfa-tubuliin/H2B-mCherry rakud | 300670

Seeding density 1 x 10⁴ rakku/cm²

Fluid renewal 2 kuni 3 korda nädalas

Post-Thaw Recovery Pärast sulatamist asetage rakud plaadile tihedusega 5 x 10⁴ rakku/cm² ja laske rakkudel külmutamisprotsessist taastuda ja kinnituda vähemalt 24 tunni jooksul.

Freeze medium Krüosäilitusvedelikusena kasutame täielikku kasvukeskkonda (sh FBS) + 10% DMSO, et tagada piisav elujõulisus pärast sulatamist, või CM-1 (Cytioni katalooginumbriga 800100), mis sisaldab optimeeritud osmoprotektante ja metaboolseid stabilisaatoreid, et parandada taastumist ja vähendada krüostressi.

Thawing and Culturing Cells

1. Veenduge, et vial jääb tarnimisel sügavkülmutatud, sest rakud transporditakse kuiva jääga, et säilitada optimaalne temperatuur transpordi ajal.
2. Pärast kättesaamist säilitage krüoviaal kas kohe temperatuuril alla -150 °C, et tagada rakkude terviklikkuse säilimine, või jätkake sammuga 3, kui on vaja koheselt kultiveerida.
3. Kohese kultiveerimise korral sulatage viali kiiresti, kastes selle 37 °C veevanni puhta vee ja antimikroobse ainega, segades seda õrnalt 40-60 sekundit, kuni alles jääb väike jääklomp.
4. Tehke kõik järgmised toimingud steriilsetes tingimustes vooluhoodis, desinfitseerides krüoviaal enne avamist 70% etanooliga.
5. Avage desinfitseeritud viali ettevaatlikult ja viige rakususpensioon ettevaatlikult segades 15 ml tsentrifuugitorusse, mis sisaldab 8 ml toatemperatuuril olevat kasvukeskkonda.
6. Rakkude eraldamiseks tsentrifuugige segu 300 x g juures 3 minutit ja visake ülejäänud külmutusvedelikku sisaldav supernatant ettevaatlikult ära.
7. Resuspendeerige rakupellet ettevaatlikult 10 ml värskes kasvukeskkonnas. Adhereerivate rakkude puhul jagage suspensioon kahe T25 kultuurkolvi vahel; suspensioonikultuuride puhul kandke kogu söötme keskkond ühte T25 kolbi, et soodustada rakkude tõhusat koostoimet ja kasvu.
8. Järgige kehtestatud subkultuuriprotokolle rakuliini jätkuvaks kasvuks ja säilitamiseks, tagades usaldusväärsed katsetulemused.

Incubation Atmosphere 37°C, 5% CO₂, niisutatud atmosfäär.

Flask Coating Puudub

HK EGFP-alfa-tubuliin/H2B-mCherry rakud | 300670

Freezing Procedure

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu -78 °C. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige viaalid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

Shipping Conditions

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu -78 °C. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige viaalid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

Storage Conditions

Pikaajaliseks säilitamiseks asetage viaalid aurufaasis vedela lämmastikuga umbes -150 kuni -196 °C juures. Säilitamine temperatuuril -80 °C on vastuvõetav ainult lühikese vaheetapina enne vedela lämmastikuga üleviimist.

Kvaliteedikontroll / Geneetiline profiil / HLA

Sterility

Mükoplasmakontaminatsioon on välistatud nii PCR-põhiste analüüside kui ka luminesentsil põhinevate mükoplasma tuvastamise meetodite abil.

Bakteriaalse, seene- või pärmsaaste puudumise tagamiseks kontrollitakse rakukultuure iga päev visuaalselt.