

HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry rakud | 300919

Üldine teave

Description

HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry rakuliin on HeLa Kyotost saadud in vitro mudel, mis on loodud kromatiini dünaamika ja tuumaarhitektuuri reaajas visualiseerimiseks elusrakkudes. See rakuliin ekspresseerib kahte fluorestseeruva valguga fusiooni: EGFP (tugevdatud roheline fluorestseeruv valk), mis on fusioonis Lamin B1-ga, ja mCherry (punane fluorestseeruv valk), mis on fusioonis histoon H2B-ga. EGFP fusioon Lamin B1-ga võimaldab jälgida tuumakesta ja tuumalamiini - tuuma terviklikkuse ja funktsionaalsuse säilitamise seisukohalt olulisi struktuure. Lamiinivalgud on V-tüüpi vahepealsed filamentvalgud, mis moodustavad tuuma sisemise membraani all oleva võrgustiku, millel on oluline roll tuuma stabiilsuses, kromatiini korralduses ja geeniregulatsioonis.

Teisalt võimaldab mCherry-märgistatud histoon H2B visualiseerida kromatiini tuuma sees. Histoonid on nukleosoomi põhikomponendid, mis osalevad DNA kromatiini organiseerimises, mistõttu on nad otsustava tähtsusega DNA replikatsiooni, parandamise ja transkriptsiooni jaoks. H2B-l olev mCherry märgistus annab elavat punast fluorestsentsi, mis vastandub EGFP rohelisele fluorestsentsile, võimaldades samaaegselt tuumastruktuuri ja kromatiini kahekordset pildistamist elusraku katsetes. Seda rakuliini kasutatakse tavaliselt uuringutes, mis keskenduvad tuumamehaanikale, mitoosile ja genoomi stabiilsusele, andes dünaamilise ülevaate rakulistest protsessidest, mida on muidu raske reaajas jälgida.

Organism Inimene

Tissue Emakakael

Disease Kartsinoom

Metastatic site Esmane kasvaja asukoht (emakakael)

Applications Tuuma lamina ja kromatiini struktuur; lamiini B1 dünaamika; H2B-kromatiini pildistamine; kahevärviline elusrakkude fluorestsents; tuuma mehaanika; mitoos; genoomi stabiilsus; tuumamembraani bioloogia

Synonyms HeLa Kyoto EGFP-LaminB1 ja H2B-mCherry

Omadused

Age 30 aastat

Gender Naised

Ethnicity Afroameeriklane

Morphology Epiteelilaadsed rakud, millel on mosaiikne kivikuju

HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry rakud | 300919

Cell type Epiteelirakud**Growth properties** Monokihiline, kleepuv**Regulatiivsed andmed****Citation** HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry (Cytioni katalooginumber 300919)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_UR41**Depositor** Ellenbergi labor (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: See HeLa Kyoto liin sisaldab EGFP-Lamin B1 ja H2B-mCherry konstruktsioone tuumaümbrise ja kromatiini struktuuri kujutamiseks. See klassifikatsioon kehtib ainult Saksamaal ja võib mujal erineda.**Biomolekulaarsed andmed****Protein expression** EGFP-LaminB1/H2B-mCherry**Products** Histoos H2B**Töötlemine****Culture Medium** DMEM, w: 4,5 g/L glükoosi, w: 4 mM L-glutamiini, w: 3,7 g/L NaHCO₃, w: 1,0 mM naatriumpüruvaati (Cytioni artikli number 820300a)**Supplements** Täiendada söötme 10% FBS-ga**Dissociation Reagent** Accutase

HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry rakud | 300919

Subculturing Eemaldage kleepunud rakkudel 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 tsentrifuugige 3 minutit 300xg juures. Visake supernatant ära, suspenseerige rakud uuesti värskes keskkonnas ja viige need uutesse kolvidesse, mis sisaldavad juba värsket keskkonda.

Seeding density 1×10^4 rakku/cm²

Fluid renewal 2 kuni 3 korda nädalas

Post-Thaw Recovery Pärast sulatamist asetage rakud plaadile tihedusega 5×10^4 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 katalooginumber 800100), mis sisaldab optimeeritud osmoprotektante ja metaboolseid stabilisaatoreid, et parandada taastumist ja vähendada krüostressi.

HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry rakud | 300919**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 $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, et tagada rakkude terviklikkuse säilimine, või jätkake sammuga 3, kui on vaja koheselt kultiveerida.
3. Kohese kultiveerimise korral sulatage viali kiiresti, kastes selle $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 rakuksuspensioon ettevaatlikult segades 15 ml tsentrifuugitorusse, mis sisaldab 8 ml toatemperatuuril olevat kasvukeskkonda.
6. Rakkude eraldamiseks tsentrifuugige segu $300 \times g$ 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**

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , niisutatud atmosfäär.

Flask Coating

Puudub

**Freezing
Procedure**

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige vialid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

**Shipping
Conditions**

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige vialid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry rakud | 300919

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.