

HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry-solut HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry-solut | 300919

Yleisiä tietoja

Description

HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry-solulinja on HeLa Kiotosta peräisin oleva in vitro -malli, joka on suunniteltu kromatiinin dynamiikan ja ydinarkkitehtuurin reaaliaikaiseen visualisointiin elävissä soluissa. Tämä solulinja ilmentää kahta fluoresoivaa proteiinifuusiota: EGFP (tehostettu vihreä fluoresoiva proteiini), joka on fuusioitu Lamin B1:n kanssa, ja mCherry (punainen fluoresoiva proteiini), joka on fuusioitu histoni H2B:n kanssa. EGFP:n fuusio lamiini B1:n kanssa mahdollistaa ydinkuoren ja ydinlaminan havainnoinnin, sillä nämä rakenteet ovat kriittisiä ytimen eheyden ja toimivuuden ylläpitämisen kannalta. Lamiiniproteiinit ovat V-tyypin väliketjuproteiineja, jotka muodostavat sisemmän ydinkalvon alla olevan verkoston ja joilla on keskeinen rooli ytimen vakaudessa, kromatiinin järjestäytymisessä ja geenien säätelyssä.

Toisaalta mCherry-merkitty histoni H2B mahdollistaa kromatiinin visualisoinnin tumen sisällä. Histonit ovat nukleosomin peruskomponentteja, jotka osallistuvat DNA:n järjestäytymiseen kromatiiniksi ja ovat siten ratkaisevan tärkeitä DNA:n replikaatiolle, korjaukselle ja transkriptionille. H2B:n mCherry-merkki tuottaa eloisa punaista fluoresenssia, joka erottuu EGFP:n vihreästä fluoresenssista, mikä mahdollistaa samanaikaisen kaksoiskuvan antamisen ytimen rakenteesta ja kromatiinista elävässä solussa tehtävissä kokeissa. Tätä solulinjaa käytetään yleisesti tutkimuksissa, joissa keskitytään ydinmekaniikkaan, mitooseihin ja genomien vakautteen, ja se tarjoaa dynaamisen näkymän soluprosesseihin, joita on muuten vaikea havainnoida reaaliajassa.

Organism Ihminen

Tissue Kohdunkaula

Disease Syöpä

Synonyms HeLa Kyoto EGFP-LaminB1 ja H2B-mCherry

Ominaisuudet

Age 30 vuotta

Gender Nainen

Ethnicity Afroamerikkalainen

Morphology Epiteelin kaltaiset solut, joilla on mosaiikkimaisen kiven muotoinen rakenne

Growth properties Yksikerroksinen, tarttuva

Säätelytiedot

HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry-solut HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry-solut | 300919

Citation HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry (Cytionin luettelonumero 300919)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

CellosaurusAccession CVCL_UR41

Depositor Ellenbergin laboratorio (EMBL)

GMO Status GMO-S1: Tämä HeLa Kyoto -linja sisältää EGFP-Lamin B1- ja H2B-mCherry-rakenteita ydinvaipan ja kromatiinin organisaation kuvantamiseen. Tämä luokitus koskee vain Saksaa ja voi olla erilainen muualla.

Biomolekyyli tiedot

Protein expression EGFP-LaminB1/H2B-mCherry

Products Histoni H2B

Käsittely

Culture Medium DMEM, w: 4,5 g/l glukoosia, w: 4 mM L-glutamiinia, w: 3,7 g/l NaHCO₃, w: 1,0 mM natriumpyruvaattia (Cytionin artikkelinumero 820300a)

Supplements Täydennetään elatusainetta 10 %:lla FBS:llä

Dissociation Reagent Accutase

Subculturing Poista vanha väliaine tarttuneista soluista ja pese ne PBS:llä, josta puuttuu kalsiumia ja magnesiumia. Käytä T25-pulloissa 3-5 ml PBS:ää ja T75-pulloissa 5-10 ml. Peitä sitten solut kokonaan Accutase-valmisteella, käyttäen 1-2 ml T25-pulloissa ja 2,5 ml T75-pulloissa. Anna solujen inkuboitua huoneenlämmössä 8-10 minuuttia solujen irtoamiseksi. Inkuboinnin jälkeen solut sekoitetaan varovasti 10 ml:n väliaineella niiden resuspendoimiseksi ja sentrifugoidaan sitten 300xg:n nopeudella 3 minuutin ajan. Hävitä supernatantti, suspendoi solut uudelleen tuoreessa väliaineessa ja siirrä ne uusiin pulloihin, jotka sisältävät jo tuoretta väliaineita.

Seeding density 1×10^4 solua/cm²

Fluid renewal 2-3 kertaa viikossa

HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry-solut HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry-solut | 300919

Post-Thaw Recovery

Sulattamisen jälkeen levitä solut 5×10^4 solua/cm² ja anna solujen toipua pakastusprosessista ja kiinnittyä vähintään 24 tunnin ajan.

Freeze medium

Kryosäilytysmediana käytämme täydellistä kasvualustaa (mukaan lukien FBS) + 10 % DMSO:ta riittävän sulatuksen jälkeisen elinkelpoisuuden varmistamiseksi tai CM-1:tä (Cytionin luettelonumero 800100), joka sisältää optimoituja osmoprotektantteja ja metabolisia stabilisaattoreita, jotka parantavat elpymistä ja vähentävät kryosäilytyksen aiheuttamaa stressiä.

Thawing and Culturing Cells

1. Varmista, että injektiopullo pysyy syväjäädetytynä toimitettaessa, sillä solut kuljetetaan kuivajäädessä, jotta optimaalinen lämpötila säilyy kuljetuksen aikana.
2. Vastaanotettaessa kryopullo joko säilytetään välittömästi alle -150 °C:n lämpötilassa solujen eheyden säilyttämiseksi tai edetään vaiheeseen 3, jos tarvitaan välitöntä viljelyä.
3. Välitöntä viljelyä varten sulata injektiopullo nopeasti upottamalla se 37 °C:n vesihauteeseen, jossa on puhdasta vettä ja antimikrobista ainetta, ja sekoittamalla sitä varovasti 40-60 sekunnin ajan, kunnes jäädästä on jäljellä pieni jäämöhkäle.
4. Suorita kaikki seuraavat vaiheet steriileissä olosuhteissa virtaushupussa ja desinfioi kryopullo 70-prosenttisella etanolilla ennen avaamista.
5. Avaa desinfioitu injektiopullo varovasti ja siirrä solususpensio 15 ml:n sentrifugiputkeen, joka sisältää 8 ml huoneenlämpöistä elatusainetta, varovasti sekoittaen.
6. Sentrifugoi seosta 300 x g:n voimakkuudella 3 minuutin ajan solujen erottamiseksi ja hävitä varovasti supernatantti, joka sisältää jäännöspakastusmediumia.
7. Suspendoidaan solupelletti varovasti uudelleen 10 ml:aan tuoretta elatusainetta. Jos solut ovat tarttuvia, jaa suspensio kahden T25-kolvin kesken; jos kyseessä ovat suspensioviljelmät, siirrä kaikki väliaine yhteen T25-kolviin solujen tehokkaan vuorovaikutuksen ja kasvun edistämiseksi.
8. Noudata vakiintuneita aliviljelyprotokollia solulinjan jatkuvan kasvun ja ylläpidon varmistamiseksi ja luotettavien kokeellisten tulosten varmistamiseksi.

Incubation Atmosphere

37 °C, 5 % CO₂, kostutettu ilmakehä.

Flask Coating

Ei mitään

HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry-solut HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry-solut | 300919

Freezing Procedure

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäässä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

Shipping Conditions

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäässä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

Storage Conditions

Pitkäaikais säilytystä varten injektiopullot asetetaan höyryfaasissa olevaan nestemäiseen tyypeen noin -150 - -196 °C:een. Säilytys -80 °C:ssa on hyväksyttävää vain lyhyenä välivaiheena ennen siirtoa nestemäiseen tyypeen.

Laadunvalvonta / Geneettinen profiili / HLA

Sterility

Mykoplasma kontaminaatio suljetaan pois sekä PCR-pohjaisilla määrittelyillä että luminesenssiin perustuvilla mykoplasman osoitusmenetelmillä.

Bakteeri-, sieni- tai hiivakontaminaation välttämiseksi soluviljelmät tarkastetaan päivittäin silmämääräisesti.