

HK EGFP-alfa-tubulin/H2B-mCherry sejtek | 300670

Általános információk

Description

A HK EGFP-alfa-tubulin/H2B-mCherry HeLa Kyoto sejt vonal egy aprólékosan megtervezett modell, amelyet a sejt folyamatok részletes vizualizálására terveztek. Ezt a klonális vonalat stabilan transzfektálták, hogy két fluoreszcens fehérje fúziót expresszáljon, amelyek lehetővé teszik mind a kromatin, mind a mikrotubuláris hálózat valós idejű képalkotását. Az mCherry vörös fluoreszcens fehérjét a H2B központi hisztonfehérjéhez fuzionálták, létrehozva a H2B-mCherry-t. Ez a fúziós fehérje a pH2B-mCherry-IRES-neo3 plazmidből expresszálódik, és kromatin markerként szolgál, kiemelve a nukleáris DNS-t élősejtes képalkotásban, és megkönnyítve a kromatin dinamikájának és a nukleáris architektúrájának a vizsgálatát.

Ezenkívül ez a sejt vonal α -tubulinhoz fuzionált monomerekus, fokozott GFP-t (zöld fluoreszcens fehérje) expresszál, amelyet a pmEGFP- α -tubulin-IRES-puro2b plazmidon keresztül juttatunk be. A GFP- α -tubulin fúzió élénk zöld fluoreszcenciát biztosít, amely kirajzolja a sejtben lévő mikrotubulus struktúrákat. Ez a tulajdonság kulcsfontosságú a mikrotubulusok szerveződésének, dinamikájának, valamint a sejtosztódásban és a sejtben belüli transzportban betöltött szerepüknek a tanulmányozásához. E konstrukciók stabil integrációja lehetővé teszi e sejt komponensek folyamatos, hosszú távú megfigyelését ismételt transzfekeció nélkül, így csökkentve a variabilitást és növelve a kísérleti eredmények megbízhatóságát. A transzfekeciót követő gyógyszerrezisztencia-szelekció biztosítja a stabilitást és az expresszió egységességét a sejtek között ebben a vonalban.

Organism

Emberi

Tissue

Cervix

Disease

Karcinóma

Synonyms

HeLa Kiotói EGFP- α -tubulin/H2B-mCherry, HeLa H2B-mRFP és mEGFP- α -tubulin

Jellemzők

Age

30 év

Gender

Női

Ethnicity

Afroamerikai

Morphology

Epithelszerű, mozaikos kő alakú sejtek

Growth properties

Monoréteg, tapadó

Szabályozási adatok

HK EGFP-alfa-tubulin/H2B-mCherry sejtek | 300670

Citation	HK EGFP-alfa-tubulin/H2B-mCherry (Cytion katalógusszám: 300670)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_L802
Depositor	Az Ellenberg Labor (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Ez a HeLa Kyoto vonal EGFP- α -tubulin és H2B-mCherry konstrukciókat tartalmaz a mikrotubulusok és a kromatin egyidejű képzéséhez. Ez a besorolás csak Németországban érvényes, más országokban eltérő lehet.

Biomolekuláris adatok

Protein expression	EGFP-alfa-tubulin, H2B-mCherry: 589 / Pcmv, 652..1029 H2B, 1042..1752 / mCherry, 2983..3777 / KanR/NeoR
Viruses	HIV, HBV és HCV negatív.
Products	CMV promotor, Hiszton H2B, neomicin, foszfotranszferáz, foszfotranszferáz

A kezelése

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/L glükóz, w: 4 mM L-Glutamin, w: 3,7 g/L NaHCO ₃ , w: 1,0 mM nátrium-piruvát (Cytion cikkszám 820300a)
Supplements	A táptalajt egészítsük ki 10% FBS-szel
Dissociation Reagent	Accutase
Doubling time	24 óra
Subculturing	Távolítsa el a régi táptalajt a megtapadt sejtekről, és mossa őket kalcium- és magnéziummentes PBS-szel. T25-ös lombikokhoz 3-5 ml PBS-t, T75-ös lombikokhoz pedig 5-10 ml-t használjunk. Ezután fedjük be a sejteket teljesen Accutase-zal, T25 lombikok esetében 1-2 ml-t, T75 lombikok esetében 2,5 ml-t használva. A sejteket 8-10 percig hagyjuk szobahőmérsékleten inkubálni, hogy leváljanak. Az inkubálás után óvatosan keverjük össze a sejteket 10 ml tápfolyadékkal, hogy reszuszpendáljuk őket, majd centrifugáljuk 300xg-nél 3 percig. Dobja el a felülúszót, szuszpendálja újra a sejteket friss tápfolyadékban, és helyezze át őket új lombikokba, amelyek már friss tápfolyadékot tartalmaznak.

HK EGFP-alfa-tubulin/H2B-mCherry sejtek | 300670

Seeding density 1×10^4 sejt/cm²

Fluid renewal hetente 2-3 alkalommal

Post-Thaw Recovery Felolvasztás után helyezze a sejteket 5×10^4 sejt/cm² sűrűséggel lemezre, és hagyja, hogy a sejtek felolvadjanak és legalább 24 órán át tapadjanak.

Freeze medium Krioprezerváló táptalajként teljes növekedési táptalajt (beleértve az FBS-t) + 10% DMSO-t használunk a megfelelő kiolvasztás utáni életképesség érdekében, vagy CM-1-et (Cytion katalógusszám: 800100), amely optimalizált ozmoprotektánsokat és metabolikus stabilizátorokat tartalmaz a regenerálódás fokozása és a krioindukált stressz csökkentése érdekében.

Thawing and Culturing Cells

1. Ellenőrizze, hogy az injekciós üveg a szállításkor mélyhűtött marad-e, mivel a sejteket szárazjégen szállítják, hogy a szállítás során az optimális hőmérsékletet fenntartsák.
2. Átvételt követően vagy azonnal tárolja a krioampullát -150 °C alatti hőmérsékleten a sejtek integritásának megőrzése érdekében, vagy folytassa a 3. lépéssel, ha azonnali tenyésztésre van szükség.
3. Azonnali tenyésztés esetén gyorsan fel kell olvasztani az injekciós üveget úgy, hogy tiszta vízzel és antimikrobiális szerrel ellátott 37 °C-os vízfürdőbe merítjük, és 40-60 másodpercig óvatosan kevergetjük, amíg egy kis jégcsomó nem marad.
4. Az összes további lépést steril körülmények között, áramlásos elszívóban végezzük el, és nyitás előtt fertőtlenítsük a krioüklét 70%-os etanollal.
5. Óvatosan nyissa fel a fertőtlenített fiolát, és a sejtuszpenziót óvatosan összekeverve helyezze át egy 15 ml-es centrifugacsőbe, amely 8 ml szobahőmérsékletű táptalajt tartalmaz.
6. Centrifugáljuk az elegyet 300 x g-n 3 percig a sejtek szétválasztásához, és óvatosan dobjuk el a maradék fagyasztóközeget tartalmazó felülúszót.
7. Óvatosan szuszpendáljuk újra a sejt pelletet 10 ml friss táptalajban. Adhezív sejtek esetében ossza a szuszpenziót két T25-ös tenyésztőlombik között; szuszpenziós kultúrák esetében az összes tápfolyadékot tegye át egy T25-ös lombikba a hatékony sejtkölcsönhatás és növekedés elősegítése érdekében.
8. A sejt vonal folyamatos növekedése és fenntartása érdekében tartsa be a megállapított szubkultúra protokollokat, biztosítva a megbízható kísérleti eredményeket.

Incubation Atmosphere 37°C, 5% CO₂, párasított légkör.

HK EGFP-alfa-tubulin/H2B-mCherry sejtek | 300670

Flask Coating Nincs

Freezing Procedure

A kriokonzervált sejtvonalatokat szárazjégen, validált, szigetelt csomagolásban szállítják, elegendő hűtőközeggel, hogy a szállítás során a hőmérsékletet körülbelül $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartsák. Átvételkor azonnal vizsgálja meg a tárolóedényt, és haladéktalanul helyezze át az injekciós üvegeket a megfelelő tárolóhelyre.

Shipping Conditions

A kriokonzervált sejtvonalatokat szárazjégen, validált, szigetelt csomagolásban szállítják, elegendő hűtőközeggel, hogy a szállítás során a hőmérsékletet körülbelül $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartsák. Átvételkor azonnal vizsgálja meg a tárolóedényt, és haladéktalanul helyezze át az injekciós üvegeket a megfelelő tárolóhelyre.

Storage Conditions

Hosszú távú tartósítás céljából helyezze az üvegeket gőzfázisú folyékony nitrogénbe, körülbelül -150 és $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérsékleten. A $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő tárolás csak rövid átmeneti lépésként fogadható el a folyékony nitrogénbe való átvitel előtt.

Minőségellenőrzés / Genetikai profil / HLA

Sterility

A mikoplazma-szennyeződést mind a PCR-alapú vizsgálatokkal, mind a lumineszcencia-alapú mikoplazma-kimutatási módszerekkel kizárják.

A bakteriális, gombás vagy élesztőgombás szennyeződés elkerülése érdekében a sejt kultúrákat napi vizuális ellenőrzésnek vetik alá.