

HK EGFP-alfa-tubulino/H2B-mCherry ląstelės | 300670

Bendra informacija

Description

HK EGFP-alfa-tubulino/H2B-mCherry HeLa Kyoto ląstelių linija yra kruopščiai sukurtas modelis, skirtas išsamiam ląstelių procesų vizualizavimui. Ši kloninė linija stabiliai užkrėsta dviem fluorescuojančių baltymų junginiais, kurie leidžia realiuoju laiku matyti chromatiną ir mikrovamzdelių tinklą. Raudonasis fluorescencinis baltymas mCherry sujungtas su pagrindiniu histono baltymu H2B, sukuriant H2B-mCherry. Šis sintezės baltymas išreiškiamas iš pH2B-mCherry-IRES-neo3 plazmidės ir naudojamas kaip chromatinio žymeklis, išryškinantis branduolio DNR gyvų ląstelių vaizdavimo metu ir palengvinantis chromatinio dinamikos ir branduolio architektūros tyrimus.

Be to, ši ląstelių linija išreiškia monomerinį sustiprintą GFP (žaliąjį fluorescencinį baltymą), sujungtą su α -tubulino, įvestą per pmEGFP- α -tubulin-IRES-puro2b plazmidę. GFP- α -tubulino sintezė suteikia ryškią žalią fluorescenciją, kuri apibrėžia mikrotubulų struktūras ląstelėje. Ši savybė labai svarbi tiriant mikrotubulų organizaciją, dinamiką ir jų vaidmenį ląstelės dalijimuisi bei viduląsteliniam pernešimui. Stabili šių konstruktyvų integracija leidžia nuolat, ilgą laiką stebėti šiuos ląstelių komponentus be pakartotinės transfekcijos, taip sumažinant kintamumą ir padidinant eksperimentų rezultatų patikimumą. Atsparumo vaistams atranka po transfekcijos užtikrina šios linijos ląstelių raiškos stabilumą ir vienodumą.

Organism

Žmogus

Tissue

Gimdos kaklelis

Disease

Karcinoma

Synonyms

HeLa Kyoto EGFP- α -tubulinas/H2B-mCherry, HeLa H2B-mRFP ir mEGFP-alfa-tubulinas

Charakteristikos

Age

30 metų

Gender

Moteris

Ethnicity

Afroamerikietis

Morphology

| epitelį panašios ląstelės su mozaikos formos akmenukais

Growth properties

Viensluoksnis, prigludęs

Reguliavimo duomenys

Citation

HK EGFP-alfa-tubulinas/H2B-mCherry (Cytion katalogo numeris 300670)

HK EGFP-alfa-tubulino/H2B-mCherry ląstelės | 300670

Biosafety level 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_L802**Depositor** Ellenbergo laboratorija (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Ši HeLa Kyoto linija turi EGFP- α -tubulin ir H2B-mCherry konstrukcijas, skirtas vienu metu vaizduoti mikrotubules ir chromatinas. Ši klasifikacija taikoma tik Vokietijoje ir kitose šalyse gali skirtis.**Biomolekuliniai duomenys****Protein expression** EGFP-alfa-tubulinas, H2B-mCherry: Vieta/genas: 1..589 / Pcmv, 652..1029 H2B, 1042..1752 / mCherry, 2983..3777 / KanR/NeoR**Viruses** Neigiami ŽIV, HBV ir HCV testai.**Products** CMV Promotor, Histonas H2B, Neomicinas, Fosfotransferazė**Tvarkymas****Culture Medium** DMEM, š: 4,5 g/l gliukozės, š: 4 mM L-glutamino, š: 3,7 g/l NaHCO₃, š: 1,0 mM natrio piruvato (Cytion gaminio numeris 820300a)**Supplements** Papildykite terpę 10 % FBS**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** 24 valandos**Subculturing** Pašalinkite seną terpę nuo prilipusių ląstelių ir nuplaukite jas PBS, kuriame nėra kalcio ir magnio. T25 kolboms naudokite 3-5 ml PBS, o T75 kolboms - 5-10 ml. Tuomet visiškai užpilkite ląsteles "Accutase", naudodami 1-2 ml T25 kolboms ir 2,5 ml T75 kolboms. Leiskite ląstelėms inkubuotis kambario temperatūroje 8-10 minučių, kad jos atsiskirtų. Po inkubacijos atsargiai sumaišykite ląsteles su 10 ml terpės, kad jos vėl suspenduotų, tada 3 minutes centrifuguokite 300xg greičiu. Išmeskite supernatantą, vėl sutirpinkite ląsteles šviežioje terpėje ir perkelkite jas į naujas kolbas, kuriose jau yra šviežia terpė.**Seeding density** 1×10^4 ląstelės/cm²

HK EGFP-alfa-tubulino/H2B-mCherry ląstelės | 300670**Fluid renewal** 2-3 kartus per savaitę**Post-Thaw Recovery** Atšildžius, išdėliokite ląsteles 5×10^4 ląstelių/cm² tankumu ir leiskite ląstelėms atsigauti po užšaldymo proceso ir prisitvirtinti bent 24 valandas.**Freeze medium** Kaip kriokonservavimo terpę naudojame visišką augimo terpę (įskaitant FBS) + 10 % DMSO, kad būtų užtikrintas tinkamas gyvybingumas po atšildymo, arba CM-1 (Cytion katalogo numeris 800100), kurioje yra optimizuotų osmoprotektorių ir medžiagų apykaitos stabilizatorių, kad būtų pagerintas atsigavimas ir sumažintas kriokonservavimo sukeltas stresas.**Thawing and Culturing Cells**

1. Patikrinkite, ar pristatant buteliuką jis išlieka gerai užšaldytas, nes ląstelės gabenamos ant sauso ledo, kad gabenimo metu būtų palaikoma optimali temperatūra.
2. Gavę iš karto laikykite kriovialą žemesnėje nei -150 °C temperatūroje, kad užtikrintumėte ląstelių vientisumo išsaugojimą, arba pereikite prie 3 veiksmo, jei reikia nedelsiant kultivuoti.
3. Jei norite nedelsiant pradėti kultivuoti, greitai atšildykite buteliuką panardindami jį į 37 °C temperatūros vandens vonelę su švariu vandeniu ir antimikrobine priemone, švelniai maišydami 40-60 sekundžių, kol liks nedidelis ledo gabalėlis.
4. Visus tolesnius veiksmus atlikite steriliomis sąlygomis srauto gaubte, prieš atidarydami kriovialą dezinfekuokite jį 70 % etanoliu.
5. Atsargiai atidarykite dezinfekuotą buteliuką ir perpilkite ląstelių suspensiją į 15 ml centrifugos mėgintuvėlį, kuriame yra 8 ml kambario temperatūros mitybinės terpės, atsargiai išmaišykite.
6. Mišinį centrifuguokite 300 x g greičiu 3 minutes, kad atsiskirtų ląstelės, ir atsargiai išmeskite supernatantą su šaldymo terpės likučiais.
7. Švelniai resuspenduokite ląstelių granules 10 ml šviežios mitybinės terpės. Jei ląstelės yra prigludusios, suspensiją padalykite į dvi T25 kolbas; jei tai suspensinės kultūros, visą terpę perkelkite į vieną T25 kolbą, kad paskatintumėte veiksmingą ląstelių sąveiką ir augimą.
8. Laikykitės nustatytų subkultūrų protokolų, kad ląstelių linija nuolat augtų ir būtų palaikoma, taip užtikrinant patikimus eksperimentų rezultatus.

Incubation Atmosphere 37 °C, 5 % CO₂, drėkintoje atmosferoje.**Flask Coating** Nėra

HK EGFP-alfa-tubulino/H2B-mCherry ląstelės | 300670

Freezing Procedure

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug -78°C temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelkite mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

Shipping Conditions

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug -78°C temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelkite mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

Storage Conditions

Norėdami ilgai saugoti, įdėkite buteliukus į garų fazės skystą azotą maždaug -150 - 196°C temperatūroje. Laikymas -80°C temperatūroje yra priimtinas tik kaip trumpas tarpinis etapas prieš perkeliant į skystąjį azotą.

Kokybės kontrolė / Genetinis profilis / HLA

Sterility

Mikoplazmos užterštumas atmetamas taikant PGR pagrįstus tyrimus ir liuminescencinius mikoplazmos aptikimo metodus.

Siekiant užtikrinti, kad nebūtų užteršimo bakterijomis, grybeliais ar mielėmis, ląstelių kultūros kasdien vizualiai tikrinamos.