Product sheet

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 išsamiai vizualizuoti ląstelinius procesus. 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 chromatino žymeklis, išryškinantis branduolio DNR gyvų ląstelių vaizdavimo metu ir palengvinantis chromatino dinamikos ir branduolio architektūros tyrimus. Be to, ši ląstelių linija išreiškia monomerinį sustiprintą GFP (žaliąjį fluorescencinį baltymą), sujungtą su α-tubulinu, 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 konstruktų 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-a-tubulinas/H2B-mCherry, HeLa H2B-mRFP ir mEGFP-alfa-tubulinas

Charakteristikos

Age	30 metų
Gender	Moteris
Ethnicity	Afroamerikietis
Morphology	Į epitelį panašios ląstelės su mozaikos formos akmenukais
Growth properties	Viensluoksnis, prigludęs

Reguliavimo duomenys

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

Product sheet

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 x 10^4 ląstelės/cm^2

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

Fluid renewal	2-3 kartus per savaitę
Post-Thaw Recovery	Atšildžius, išdėliokite ląsteles 5 x 10^4 ląstelių/cm^2 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 ir molekulinė analizė

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.