

HK Mad2-LAP/H2B-mCherry ląstelės | 300920

Bendra informacija

Description

HK Mad2-LAP/H2B-mCherry ląstelių linija yra genetiškai modifikuotas ląstelių modelis, plačiai naudojamas tiriant chromosomų segregaciją ir verpstės surinkimo kontrolinį tašką mitozės metu. Šios ląstelės yra kilusios iš HeLa Kyoto ląstelių, tvirtų žmogaus ląstelių linijos, iš pradžių paimtos iš gimdos kaklelio karcinomos. Ląstelių linijos HK Mad2-LAP (su LAP žymėtu Mad2) aspektas palengvina Mad2 baltymo, svarbiausio verpstės surinkimo kontrolės punkto komponento, neleidžiančio prasidėti anafazei, kol visos chromosomos nėra tinkamai išlygintos metafazės plokštelėje, vizualizaciją ir funkcinę analizę.

H2B-mCherry, kai histonas H2B žymimas mCherry fluorescenciniu baltymu, inkorporavimas leidžia realiuoju laiku vaizduoti chromatiną dinamiką ląstelės dalijimosi metu. Dėl šios savybės HK Mad2-LAP/H2B-mCherry ląstelių linija yra puikus įrankis didelės skiriamosios gebos tiesioginio ląstelių vaizdavimo metodams, skirtiems stebėti chromosomų judėjimą ir mitozės eigą žmogaus ląstelėse įvairiomis eksperimentinėmis sąlygomis. Naudojant fluorescencines žymes galima tiksliai sekti ir kiekybiškai įvertinti, taip gaunant vertingų įžvalgų apie molekulinį mechanizmą, reguliuojančius ląstelių ciklo reguliavimą ir chromosomų stabilumą.

Organism Žmogus

Tissue Gimdos kaklelis

Disease Karcinoma

Synonyms HeLa Kyoto Mad2-LAP ir H2B-mCherry, HeLa Kyoto Mad2-LAP

Charakteristikos

Age 30 metų

Gender Moteris

Ethnicity Afroamerikietis

Morphology | epitelį panašios ląstelės su mozaikos formos akmenukais

Growth properties Viensluoksnis, prigludęs

Reguliavimo duomenys

Citation HK Mad2-LAP/H2B-mCherry (Cytion katalogo numeris 300920)

Biosafety level 1

HK Mad2-LAP/H2B-mCherry ląstelės | 300920

NCBI_TaxID 9606

CellosaurusAccession CVCL_1D65

Depositor Ellenbergo laboratorija (EMBL)

GMO Status GMO-S1: Ši HeLa Kyoto linija turi Mad2-LAP ir H2B-mCherry konstrukcijas, leidžiančias vizualizuoti verpstės kontrolės taško dinamiką. Ši klasifikacija taikoma tik Vokietijoje ir kitose šalyse gali skirtis.

Biomolekuliniai duomenys

Protein expression Mad2-LAP/H2B-mCherry

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

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

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.

HK Mad2-LAP/H2B-mCherry ląstelės | 300920

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 $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 perkelti 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

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , drėkintoje atmosferoje.

Flask Coating

Nėra

Freezing Procedure

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelti 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 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelti mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

HK Mad2-LAP/H2B-mCherry ląstelės | 300920

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 skystą 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.