

HK EGFP-LaminA/H2B-mCherry šūnas | 300921

Vispārīga informācija

Description

HK EGFP-LaminA/H2B-mCherry šūnu līnija ir ģenētiski modificēts HeLa Kyoto atvasināts šūnu modelis, kas izstrādāts, lai atvieglotu progresīvu kodola dinamikas un hromatīna organizācijas pētījumus dzīvās šūnās. Šī šūnu līnija ekspresē divus saplūšanas proteīnus: EGFP (uzlabots zaļais fluorescējošais proteīns), kas saplūdis ar lamīnu A, un mCherry (sarkanais fluorescējošais proteīns), kas saplūdis ar histonu H2B. EGFP un lamīna A sintēze izceļ kodola apvalku un ļauj vizualizēt kodola arhitektūras izmaiņas šūnu cikla attīstības laikā vai dažādos eksperimentālos apstākļos. Savukārt H2B-mCherry saplūšanas proteīns saistās ar DNS un nodrošina spilgtu sarkanu fluorescenci, kas iezīmē hromatīnu, ļaujot reāllaikā novērot hromosomu procesus mitozes un interfāzes laikā.

Šīs šūnas ir nenovērtējamas reāllaika attēlveidošanas lietojumiem, tostarp pētījumiem par kodola integritāti, DNS replikāciju un šūnu novecošanos, kā arī pētījumiem par slimībām, kurās ir traucēta kodola arhitektūra, piemēram, vēzi un laminopātijas. Šīs šūnu līnijas divkrāsu fluorescences funkcija ļauj vienlaicīgi vizualizēt gan kodola apvalku, gan hromatīnu, veicinot visaptverošu izpratni par kodola un citoplazmas mijiedarbību un hromatīna telpiski temporālo organizāciju. Šādas iespējas padara to par ļoti svarīgu rīku molekulārās bioloģijas pētījumos un šūnu biofizikā, sniedzot ieskatu gēnu ekspresijas regulēšanas mehānismā, kodola organizācijā un šūnu ciklā.

Organism

Cilvēks

Tissue

Dzemes kakls

Disease

Karcinoma

Synonyms

HeLa Kioto EGFP-LaminA un H2B-mCherry

Raksturojums

Age

30 gadi

Gender

Sievietes

Ethnicity

Afroamerikānis

Morphology

Epitēlijveidīgas šūnas ar mozaikveida akmens formu

Growth properties

Vienslāņa, adhēzija

Normatīvie dati

HK EGFP-LaminaA/H2B-mCherry šūnas | 300921

Citation HK EGFP-LaminaA/H2B-mCherry (Cytion kataloga numurs 300921)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

CellosaurusAccession CVCL_1D62

Depositor Ellenberga laboratorija (EMBL)

GMO Status GMO-S1: Šī HeLa Kyoto līnija satur EGFP-Lamin A un H2B-mCherry konstrukcijas, kas ļauj veikt divkrāsu attēlveidošanu kodola laminas un hromatīna. Šī klasifikācija attiecas tikai uz Vāciju un citās valstīs var atšķirties.

Biomolekulārie dati

Protein expression EGFP-LaminaA/H2B-mCherry

Products Histons H2B

Darbs ar

Culture Medium DMEM, w: 4,5 g/l glikozes, w: 4 mM L-glutamīna, w: 3,7 g/l NaHCO₃, w: 1,0 mM nātrija piruvāta (Cytion izstrādājuma numurs 820300a)

Supplements Papildināt barotni ar 10% FBS

Dissociation Reagent Accutase

Subculturing Noņem veco barotni no pielipušajām šūnām un mazgāt tās ar PBS, kurā nav kalcija un magnija. T25 kolbām izmantojiet 3-5 ml PBS, bet T75 kolbām - 5-10 ml. Pēc tam pilnībā pārklājiet šūnas ar Accutase, izmantojot 1-2 ml T25 kolbām un 2,5 ml T75 kolbām. Ļaujiet šūnām inkubēties istabas temperatūrā 8-10 minūtes, lai tās atdalītos. Pēc inkubācijas uzmanīgi samaisiet šūnas ar 10 ml barotnes, lai tās atkārtoti suspendētu, pēc tam centrifugējiet 3 minūtes ar 300xg. Izmetiet supernatantu, atkārtoti suspendējiet šūnas svaigā barotnē un pārvietojiet tās jaunās kolbās, kurās jau ir svaiga barotne.

Seeding density 1×10^4 šūnas/cm²

Fluid renewal 2 līdz 3 reizes nedēļā

HK EGFP-LaminaA/H2B-mCherry šūnas | 300921**Post-Thaw Recovery**

Pēc atkausēšanas izkļiedējiet šūnas uz šķīvja ar blīvumu 5×10^4 šūnas/cm² un ļaujiet šūnām atgūties no sasaldēšanas procesa un pielipt vismaz 24 stundas.

Freeze medium

Kā kriokonservēšanas barotni mēs izmantojam pilnvērtīgu augšanas barotni (ieskaitot FBS) + 10 % DMSO, lai nodrošinātu pietiekamu dzīvotspēju pēc atkausēšanas, vai CM-1 (Cytion kataloga numurs 800100), kas ietver optimizētus osmoprotektorus un metaboliskos stabilizatorus, lai uzlabotu atveseļošanos un samazinātu krioinducēto stresu.

Thawing and Culturing Cells

1. Pārlicinieties, ka pēc piegādes flakons paliek dziļi sasaldēts, jo šūnas tiek sūtītas uz sausā ledus, lai pārvadāšanas laikā saglabātu optimālu temperatūru.
2. Pēc saņemšanas vai nu nekavējoties uzglabāt kriovialu temperatūrā, kas zemāka par -150 °C, lai nodrošinātu šūnu integritātes saglabāšanu, vai arī turpināt 3. posmu, ja nepieciešama tūlītēja kultivēšana.
3. Tūlītējas kultivēšanas gadījumā ātri atkausējiet flakonu, iegremdējot to 37°C ūdens vannā ar tīru ūdeni un antibakteriālu līdzekli, viegli maisot 40-60 sekundes, līdz paliek neliels ledus gabaliņš.
4. Visas turpmākās darbības veiciet sterilos apstākļos plūsmas nosūcējā, pirms atvēršanas dezinficējot kriovialu ar 70% etanolu.
5. Uzmanīgi atveriet dezinficēto flakonu un pārnesiet šūnu suspensiju 15 ml centrifūgas mēģenē, kurā ir 8 ml istabas temperatūras barotnes, uzmanīgi samaisot.
6. Centrifugējiet maisījumu ar 300 x g 3 minūtes, lai atdalītu šūnas, un uzmanīgi izmetiet virskārtu, kas satur saldēšanas barotnes atlikumus.
7. Viegli resuspendēt šūnu granulas 10 ml svaigas barotnes. Adhēzijas šūnu gadījumā suspensiju sadalīt divās T25 kolbās; suspensijas kultūrām visu barotni pārnest vienā T25 kolbā, lai veicinātu efektīvu šūnu mijiedarbību un augšanu.
8. Ievērojiet noteiktos subkultūru protokolus, lai nodrošinātu nepārtrauktu šūnu līnijas augšanu un uzturēšanu, tādējādi nodrošinot uzticamus eksperimentu rezultātus.

Incubation Atmosphere

37°C, 5% CO₂, mitrināta atmosfēra.

Flask Coating

Neviens

HK EGFP-LaminaA/H2B-mCherry šūnas | 300921**Freezing Procedure**

Kriokonservētas šūnu līnijas tiek sūtītas uz sausā ledus apstiprinātā, izolētā iepakojumā ar pietiekamu dzesēšanas šķidruma daudzumu, lai visā transportēšanas laikā uzturētu aptuveni -78 °C temperatūru. Pēc saņemšanas nekavējoties pārbaudiet iepakojumu un nekavējoties pārvietojiet flakonus uz atbilstošu uzglabāšanas vietu.

Shipping Conditions

Kriokonservētas šūnu līnijas tiek sūtītas uz sausā ledus apstiprinātā, izolētā iepakojumā ar pietiekamu dzesēšanas šķidruma daudzumu, lai visā transportēšanas laikā uzturētu aptuveni -78 °C temperatūru. Pēc saņemšanas nekavējoties pārbaudiet iepakojumu un nekavējoties pārvietojiet flakonus uz atbilstošu uzglabāšanas vietu.

Storage Conditions

Ilgstošai uzglabāšanai flakonus ievietojiet šķidrā slāpekļī ar tvaika fāzi aptuveni -150 līdz -196 °C temperatūrā. Uzglabāšana -80 °C temperatūrā ir pieļaujama tikai kā īss starpposms pirms pārvietošanas uz šķidro slāpekli.

Kvalitātes kontrole / Ģenētiskais profils / HLA**Sterility**

Mikoplazmas piesārņojums tiek izslēgts, izmantojot gan uz PCR balstītus testus, gan uz luminiscenci balstītas mikoplazmas noteikšanas metodes.

Lai pārlicinātos, ka nav baktēriju, sēnīšu vai rauga piesārņojuma, šūnu kultūras katru dienu vizuāli pārbauda.

HLA alēles

A*: '68:02:01
B*: '15:03:01
C*: '12:03:01
DRB1*: '01:02:01
DQA1*: '01:01:02
DQB1*: '05:01:01
DPB1*: '01:01:01
E: '01:03:02