

HK EGFP-alfa-tubulīna/H2B-mCherry šūnas | 300670

Vispārīga informācija

Description

HK EGFP-alfa-tubulīna/H2B-mCherry HeLa Kyoto šūnu līnija ir rūpīgi izstrādāts modelis, kas paredzēts detalizētai šūnu procesu vizualizācijai. Šī klonālā līnija ir stabili transficēta, lai ekspresētu divas fluorescējošu proteīnu fūzijas, kas ļauj reāllaikā attēlot gan hromatīnu, gan mikrotubulāro tīklu. Sarkanais fluorescējošais proteīns mCherry ir sapludināts ar galveno histona proteīnu H2B, veidojot H2B-mCherry. Šis saplūšanas proteīns tiek ekspresēts no pH2B-mCherry-IRES-neo3 plazmīdas un kalpo kā hromatīna marķieris, izceļot kodola DNS dzīvās šūnas attēlā un atvieglojot hromatīna dinamikas un kodola arhitektūras pētījumus.

Turklāt šī šūnu līnija ekspresē monomēru pastiprinātu GFP (zaļo fluorescējošo proteīnu), kas sapludināts ar α -tubulīnu un ieviests ar pmEGFP- α -tubulīns-IRES-puro2b plazmīdas palīdzību. GFP- α -tubulīna saplūšana nodrošina spilgti zaļu fluorescenci, kas iezīmē mikrotubulu struktūras šūnā. Šī īpašība ir ļoti svarīga, lai pētītu mikrotubulu organizāciju, dinamiku un to lomu šūnu dalīšanās un iekššūnu transportā. Šo konstrukciju stabila integrācija ļauj nepārtraukti un ilgstoši novērot šos šūnu komponentus bez atkārtotas transfekcijas, tādējādi samazinot mainīgumu un uzlabojot eksperimentu rezultātu ticamību. Zāļu rezistences atlase pēc transfekcijas nodrošina šīs līnijas šūnu ekspresijas stabilitāti un vienveidību.

Organism

Cilvēks

Tissue

Dzemes kakls

Disease

Karcinoma

Synonyms

HeLa Kyoto EGFP- α -tubulīns/H2B-mCherry, HeLa H2B-mRFP un mEGFP-alfa-tubulīns

Raksturojums

Age

30 gadi

Gender

Sievietes

Ethnicity

Afroamerikānis

Morphology

Epitēlijveidīgas šūnas ar mozaikveida akmens formu

Growth properties

Vienslāņa, adhēzija

Normatīvie dati

Citation

HK EGFP-alfa-tubulīns/H2B-mCherry (Cytion kataloga numurs 300670)

HK EGFP-alfa-tubulīna/H2B-mCherry šūnas | 300670

Biosafety level 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_L802**Depositor** Ellenberga laboratorija (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Šī HeLa Kyoto līnija satur EGFP- α -tubulīna un H2B-mCherry konstrukcijas mikrocauruļu un hromatīna vienlaicīgai attēlošanai. Šī klasifikācija attiecas tikai uz Vāciju un citās valstīs var atšķirties.**Biomolekulārie dati****Protein expression** EGFP-alfa-tubulīns, H2B-mCherry: Atrašanās vieta/gēns: 1..589 / Pcmv, 652..1029 H2B, 1042..1752 / mCherry, 2983..3777 / KanR/NeoR**Viruses** Negatīvs HIV, HBV un HCV tests.**Products** CMV Promotors, Histons H2B, Neomicīns, Fosfotransferāze**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**Doubling time** 24 stundas**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

HK EGFP-alfa-tubulīna/H2B-mCherry šūnas | 300670**Fluid renewal** 2 līdz 3 reizes nedēļā**Post-Thaw Recovery** Pēc atkausēšanas izklaidējiet 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. Pārliecinieties, 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-alfa-tubulīna/H2B-mCherry šūnas | 300670

Freezing Procedure

Kriokonservētas šūnu līnijas tiek sūtītas uz sausā ledus apstiprinātā, izolētā iepakojumā ar pietiekamu dzesēšanas šķidrums 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 šķidrums 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 starposms 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.