

HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry-celler | 300919

Generell informasjon

Description

HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry-cellelinjen er en HeLa Kyoto-avledet in vitro-modell som er utviklet for sanntidsvisualisering av kromatindynamikk og kjernearkitektur i levende celler. Denne cellelinjen uttrykker to fluorescerende proteinfusjoner: EGFP (forsterket grønt fluorescerende protein) fusjonert med Lamin B1, og mCherry (et rødt fluorescerende protein) fusjonert med histon H2B. Fusjonen av EGFP med Lamin B1 gjør det mulig å observere kjernekonvolutter og kjernelaminaen, strukturer som er avgjørende for å opprettholde integriteten og funksjonaliteten til kjernen. Lamin-proteiner er type V intermediære filamentproteiner som danner et nettverk under den indre kjernemembranen, og som spiller en nøkkelrolle i kjernestabilitet, kromatinorganisering og genregulering.

På den annen side gjør det mCherry-merkede histonet H2B det mulig å visualisere kromatin inne i kjernen. Histoner er grunnleggende komponenter i nukleosomet, som er involvert i organiseringen av DNA i kromatin, noe som gjør dem avgjørende for DNA-replikasjon, -reparasjon og -transkripsjon. MCherry-taggen på H2B gir en levende rød fluorescens som står i kontrast til den grønne fluorescensen til EGFP, noe som gjør det mulig å avbilde både kjernestrukturen og kromatin i levende celleeksperimenter. Denne cellelinjen brukes ofte i studier som fokuserer på kjernemekanikk, mitose og genomstabilitet, og gir et dynamisk bilde av cellulære prosesser som det ellers er vanskelig å observere i sanntid.

Organism

Menneskelig

Tissue

Livmorhalsen

Disease

Karsinom

Metastatic site

Primær tumorlokalisering (livmorhalsen)

Applications

Kjernelamina og kromatinorganisering; dynamikken til lamin B1; avbildning av H2B-kromatin; tofarget fluorescens i levende celler; kjernemekanikk; mitose; genomstabilitet; kjernemembranbiologi

Synonyms

HeLa Kyoto EGFP-LaminB1 og H2B-mCherry

Kjennetegn

Age

30 år

Gender

Kvinne

Ethnicity

Afroamerikaner

Morphology

Epitel-lignende celler med mosaikksteinform

HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry-celler | 300919

Cell type Epitelceller**Growth properties** Monolag, vedheftende**Regulatoriske data****Citation** HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry (Cytion katalognummer 300919)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_UR41**Depositor** Ellenberg-laboratoriet (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Denne HeLa Kyoto-linjen inneholder EGFP-Lamin B1- og H2B-mCherry-konstruksjoner for avbildning av kjernenes membran og kromatinorganiseringen. Denne klassifiseringen gjelder kun i Tyskland og kan variere andre steder.**Biomolekylære data****Protein expression** EGFP-LaminB1/H2B-mCherry**Products** Histon H2B**Håndtering****Culture Medium** DMEM, m: 4,5 g/L glukose, m: 4 mM L-glutamin, m: 3,7 g/L NaHCO₃, m: 1,0 mM natriumpyruvat (Cytion artikkelnummer 820300a)**Supplements** Suppler mediet med 10 % FBS**Dissociation Reagent** Accutase

HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry-celler | 300919

Subculturing Fjern det gamle mediet fra de adherente cellene, og vask dem med PBS uten kalsium og magnesium. Bruk 3-5 ml PBS for T25-kolber og 5-10 ml for T75-kolber. Dekk deretter cellene helt med Accutase, med 1-2 ml for T25-kolber og 2,5 ml for T75-kolber. La cellene inkubere i romtemperatur i 8-10 minutter for å løsne dem. Etter inkubasjon blandes cellene forsiktig med 10 ml medium for å resuspendere dem, og sentrifuger deretter ved 300xg i 3 minutter. Kast supernatanten, resuspender cellene i nytt medium, og overfør dem til nye kolber som allerede inneholder nytt medium.

Split ratio Et forhold på 1:3 anbefales

Seeding density 1×10^4 celler/cm²

Fluid renewal 2 til 3 ganger per uke

Post-Thaw Recovery Etter tining, plasser cellene på 5×10^4 celler/cm² og la cellene komme seg etter fryseprosessen og feste seg i minst 24 timer.

Freeze medium Som kryopreserveringsmedium bruker vi komplett vekstmedium (inkludert FBS) + 10 % DMSO for tilstrekkelig levedyktighet etter opptining, eller CM-1 (Cytion-katalognummer 800100), som inneholder optimaliserte osmoprotective midler og metabolske stabilisatorer for å øke utvinningen og redusere kryoundusert stress.

HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry-celler | 300919**Thawing and
Culturing Cells**

1. Kontroller at hetteglasset er dypfrost ved levering, ettersom cellene sendes på tørris for å opprettholde optimale temperaturer under transport.
2. Ved mottak skal hetteglasset enten oppbevares umiddelbart ved temperaturer under $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ for å sikre at cellenes integritet bevares, eller gå videre til trinn 3 hvis umiddelbar dyrking er nødvendig.
3. Ved umiddelbar dyrking tiner du hetteglasset raskt ved å senke det ned i et $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ varmt vannbad med rent vann og et antimikrobielt middel, og røre forsiktig i 40-60 sekunder til det blir en liten isklump igjen.
4. Utfør alle påfølgende trinn under sterile forhold i en strømningshette, og desinfiser kryoflasken med 70 % etanol før du åpner den.
5. Åpne det desinfiserte hetteglasset forsiktig, og overfør cellesuspensjonen til et 15 ml sentrifugerør som inneholder 8 ml romtemperert dyrkingsmedium, og bland forsiktig.
6. Sentrifuger blandingen ved $300 \times g$ i 3 minutter for å separere cellene, og kast supernatanten som inneholder rester av frysemedium, forsiktig.
7. Resuspender cellepelleten forsiktig i 10 ml nytt dyrkingsmedium. For adherente celler, del suspensjonen mellom to T25-kulturkolber; for suspensjonskulturer, overfør alt mediet til én T25-kolbe for å fremme effektiv celleinteraksjon og vekst.
8. Følg etablerte subkulturprotokoller for fortsatt vekst og vedlikehold av cellelinjen, noe som sikrer pålitelige eksperimentelle resultater.

**Incubation
Atmosphere**

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , befuktet atmosfære.

Flask Coating

Ingen

**Freezing
Procedure**

Kryopreserverte cellelinjer sendes på tørris i validert, isolert emballasje med tilstrekkelig kjølemiddel til å opprettholde en temperatur på ca. $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hele transporten. Ved mottak skal beholderen inspiseres umiddelbart, og hetteglassene skal straks overføres til egnet lagringsplass.

**Shipping
Conditions**

Kryopreserverte cellelinjer sendes på tørris i validert, isolert emballasje med tilstrekkelig kjølemiddel til å opprettholde en temperatur på ca. $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hele transporten. Ved mottak skal beholderen inspiseres umiddelbart, og hetteglassene skal straks overføres til egnet lagringsplass.

HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry-celler | 300919

Storage Conditions

For langtidsoppbevaring plasseres hetteglassene i flytende nitrogen i dampfase ved ca. -150 til -196 °C. Lagring ved -80 °C er kun akseptabelt som et kort mellomtrinn før overføring til flytende nitrogen.

Kvalitetskontroll / Genetisk profil / HLA

Sterility

Mykoplasma-kontaminering utelukkes ved hjelp av både PCR-baserte analyser og luminescensbaserte metoder for påvisning av mykoplasma.

For å sikre at det ikke finnes bakterie-, sopp- eller gjærkontaminering, blir cellekulturene inspisert visuelt hver dag.