

Komórki HK EGFP-alfa-tubulina/H2B-mCherry | 300670**Informacje ogólne****Description**

Linia komórkowa HK EGFP-alfa-tubulina/H2B-mCherry HeLa Kyoto jest starannie zaprojektowanym modelem przeznaczonym do szczegółowej wizualizacji procesów komórkowych. Ta linia klonalna została stabilnie transfekowana w celu ekspresji dwóch fuzyjnych białek fluorescencyjnych, które umożliwiają obrazowanie w czasie rzeczywistym zarówno chromatyny, jak i sieci mikrotubul. Czerwone białko fluorescencyjne mCherry jest połączone z głównym białkiem histonowym H2B, tworząc H2B-mCherry. To białko fuzyjne ulega ekspresji z plazmidu pH2B-mCherry-IRES-neo3 i służy jako marker chromatyny, podkreślając jądro DNA w obrazowaniu na żywo i ułatwiając badania dynamiki chromatyny i architektury jądrowej.

Dodatkowo, ta linia komórkowa wyraża monomeryczne wzmocnione GFP (białko zielonej fluorescencji) połączone z α -tubuliną, wprowadzone przez plazmid pmEGFP- α -tubulina-IRES-puro2b. Fuzyja GFP- α -tubuliny zapewnia żywą zieloną fluorescencję, która zarysowuje struktury mikrotubul w komórce. Cecha ta ma kluczowe znaczenie dla badania organizacji i dynamiki mikrotubul oraz ich roli w podziale komórek i transporcie wewnątrzkomórkowym. Stabilna integracja tych konstrukcji pozwala na ciągłą, długoterminową obserwację tych składników komórkowych bez konieczności wielokrotnej transfekcji, zmniejszając w ten sposób zmienność i zwiększając wiarygodność wyników eksperymentalnych. Selekcja oporności na leki po transfekcji zapewnia stabilność i jednolitość ekspresji wśród komórek tej linii.

Organism

Człowiek

Tissue

Szyjka macicy

Disease

Rak

SynonymsHeLa Kyoto EGFP- α -tubulina/H2B-mCherry, HeLa H2B-mRFP i mEGFP-alfa-tubulina**Charakterystyka****Age**

30 lat

Gender

Kobieta

Ethnicity

Afroamerykanin

Morphology

Komórki podobne do nabłonka o mozaikowym kształcie kamienia

Growth properties

Monowarstwa, przylegająca

Dane regulacyjne

Komórki HK EGFP-alfa-tubulina/H2B-mCherry | 300670

Citation	HK EGFP-alfa-tubulina/H2B-mCherry (numer katalogowy Cytion 300670)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_L802
Depositor	Laboratorium Ellenberg (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Ta linia HeLa Kyoto zawiera konstrukcje EGFP- α -tubulina i H2B-mCherry do jednoczesnego obrazowania mikrotubul i chromatyny. Klasyfikacja ta obowiązuje wyłącznie w Niemczech i może się różnić w innych krajach.

Dane biomolekularne

Protein expression	EGFP-alfa-tubulina, H2B-mCherry: Lokalizacja/gen: 1..589 / Pcmv, 652..1029 H2B, 1042..1752 / mCherry, 2983..3777 / KanR/NeoR
Viruses	Ujemny wynik testów na obecność wirusów HIV, HBV i HCV.
Products	Promotor CMV, histon H2B, neomycyna, fosfotransferaza

Obsługa

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/l glukozy, w: 4 mM L-glutaminy, w: 3,7 g/l NaHCO ₃ , w: 1,0 mM pirogronianu sodu (numer artykułu Cytion 820300a)
Supplements	Uzupełnić podłoże 10% FBS
Dissociation Reagent	Accutase
Doubling time	24 godziny
Subculturing	Usuń starą pożywkę z przylegających komórek i przemyj je PBS, który nie zawiera wapnia i magnezu. W przypadku kolb T25 należy użyć 3-5 ml PBS, a w przypadku kolb T75 5-10 ml. Następnie całkowicie pokryj komórki Accutase, używając 1-2 ml dla kolb T25 i 2,5 ml dla kolb T75. Pozwól komórkom inkubować w temperaturze pokojowej przez 8-10 minut, aby je oddzielić. Po inkubacji delikatnie wymieszaj komórki z 10 ml pożywki, aby ponownie je zawiesić, a następnie odwiruj przy 300xg przez 3 minuty. Odrzuć supernatant, ponownie zawiesić komórki w świeżej pożywce i przenieść je do nowych kolb zawierających już świeżą pożywkę.

Komórki HK EGFP-alfa-tubulina/H2B-mCherry | 300670

Split ratio Zalecany jest stosunek 1:3

Seeding density 1×10^4 komórek/cm²

Fluid renewal 2 do 3 razy w tygodniu

Post-Thaw Recovery Po rozmrożeniu umieść komórki na płytce w ilości 5×10^4 komórek/cm² i pozostaw je na co najmniej 24 godziny, aby mogły się zregenerować po procesie zamrażania i przylgnąć do podłoża.

Freeze medium Jako pożywki do kriokonserwacji używamy kompletnej pożywki wzrostowej (w tym FBS) + 10% DMSO w celu zapewnienia odpowiedniej żywotności po rozmrożeniu lub CM-1 (numer katalogowy Cytion 800100), która zawiera zoptymalizowane osmoprotektanty i stabilizatory metaboliczne w celu zwiększenia regeneracji i zmniejszenia stresu wywołanego kriokonserwacją.

Thawing and Culturing Cells

1. Upewnij się, że fiolka pozostaje głęboko zamrożona w momencie dostawy, ponieważ komórki są wysłane w suchym lodzie, aby utrzymać optymalną temperaturę podczas transportu.
2. Po otrzymaniu należy natychmiast przechowywać fiolkę w temperaturze poniżej -150°C, aby zapewnić zachowanie integralności komórek, lub przejść do kroku 3, jeśli wymagana jest natychmiastowa hodowla.
3. W przypadku natychmiastowej hodowli należy szybko rozmrozić fiolkę, zanurzając ją w łaźni wodnej o temperaturze 37°C z czystą wodą i środkiem przeciwdrobnoustrojowym, delikatnie mieszając przez 40-60 sekund, aż pozostanie niewielka grudka lodu.
4. Wykonaj wszystkie kolejne kroki w sterylnych warunkach w kapturze przepływowej, dezynfekując fiolkę 70% etanolem przed otwarciem.
5. Ostrożnie otworzyć zdezynfekowaną fiolkę i przenieść zawiesinę komórek do 15 ml probówki wirówkowej zawierającej 8 ml podłoża hodowlanego o temperaturze pokojowej, delikatnie mieszając.
6. Wirować mieszaninę z prędkością 300 x g przez 3 minuty w celu oddzielenia komórek i ostrożnie odrzucić supernatant zawierający pozostałości pożywki do zamrażania.
7. Delikatnie ponownie zawiesić osad komórek w 10 ml świeżego podłoża hodowlanego. W przypadku komórek przylegających, rozdzielić zawiesinę pomiędzy dwie kolby hodowlane T25; w przypadku hodowli zawiesinowych, przenieść całą pożywkę do jednej kolby T25 w celu promowania skutecznej interakcji i wzrostu komórek.
8. Przestrzegaj ustalonych protokołów podhodowli w celu ciągłego wzrostu i utrzymania linii komórkowej, zapewniając wiarygodne wyniki eksperymentów.

Komórki HK EGFP-alfa-tubulina/H2B-mCherry | 300670

Incubation Atmosphere 37°C, 5%_{CO2}, nawilżona atmosfera.

Flask Coating Brak

Freezing Procedure Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiołki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Shipping Conditions Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiołki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Storage Conditions W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiołki w ciekłym azocie w fazie lotnej w temperaturze od -150 do -196 °C. Przechowywanie w temperaturze -80 °C jest dopuszczalne tylko jako krótki etap przejściowy przed przeniesieniem do ciekłego azotu.

Kontrola jakości / Profil genetyczny / HLA

Sterility Zanieczyszczenie mykoplazmą jest wykluczane przy użyciu zarówno testów opartych na PCR, jak i metod wykrywania mykoplazmy opartych na luminescencji.

Aby upewnić się, że nie ma zanieczyszczenia bakteriami, grzybami lub drożdżami, hodowle komórkowe są poddawane codziennym kontrolom wizualnym.