

Komórki HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry | 300919**Informacje ogólne****Description**

Linia komórkowa HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry jest modelem in vitro pochodzącym z HeLa Kyoto, zaprojektowanym do wizualizacji w czasie rzeczywistym dynamiki chromatyny i architektury jądrowej w żywych komórkach. Ta linia komórkowa wyraża dwie fuzje białek fluorescencyjnych: EGFP (wzmocnione zielone białko fluorescencyjne) połączone z laminą B1 i mCherry (czerwone białko fluorescencyjne) połączone z histonem H2B. Fuzja EGFP z Laminą B1 pozwala na obserwację otoczki jądrowej i blaszki jądrowej, struktur krytycznych dla utrzymania integralności i funkcjonalności jądra. Białka laminy są białkami włókien pośrednich typu V, które tworzą siatkę leżącą pod wewnętrzną błoną jądrową, odgrywając kluczową rolę w stabilności jądra, organizacji chromatyny i regulacji genów.

Z drugiej strony, histon H2B znakowany mCherry umożliwi wizualizację chromatyny w jądrze. Histony są podstawowymi składnikami nukleosomu, zaangażowanymi w organizację DNA w chromatynę, co czyni je kluczowymi dla replikacji, naprawy i transkrypcji DNA. Znacznik mCherry na H2B zapewnia żywą czerwoną fluorescencję, która kontrastuje z zieloną fluorescencją EGFP, umożliwiając jednoczesne podwójne obrazowanie struktury jądrowej i chromatyny w eksperymentach na żywych komórkach. Ta linia komórkowa jest powszechnie stosowana w badaniach skupiających się na mechanice jądrowej, mitozie i stabilności genomu, zapewniając dynamiczny obraz procesów komórkowych, które w przeciwnym razie są trudne do zaobserwowania w czasie rzeczywistym.

Organism

Człowiek

Tissue

Szyjka macicy

Disease

Rak

Metastatic site

Miejsce występowania guza pierwotnego (szyjka macicy)

Applications

Lamina jądrowa i organizacja chromatyny; dynamika laminy B1; obrazowanie chromatyny H2B; dwukolorowa fluorescencja w żywych komórkach; mechanika jądra komórkowego; mitoz; stabilność genomu; biologia otoczki jądrowej

Synonyms

HeLa Kyoto EGFP-LaminB1 i H2B-mCherry

Charakterystyka**Age**

30 lat

Gender

Kobieta

Ethnicity

Afroamerykanin

Morphology

Komórki podobne do nabłonka o mozaikowym kształcie kamienia

Komórki HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry | 300919**Cell type** Komórki nabłonkowe**Growth properties** Monowarstwa, przylegająca**Dane regulacyjne****Citation** HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry (numer katalogowy Cytion 300919)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_UR41**Depositor** Laboratorium Ellenberg (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Ta linia HeLa Kyoto zawiera konstrukcje EGFP-Lamin B1 i H2B-mCherry do obrazowania błony jądrowej i organizacji chromatyny. Klasyfikacja ta obowiązuje wyłącznie w Niemczech i może się różnić w innych krajach.**Dane biomolekularne****Protein expression** EGFP-LaminB1/H2B-mCherry**Products** Histon H2B**Obsługa****Culture Medium** DMEM, w: 4,5 g/l glukozy, w: 4 mM L-glutaminy, w: 3,7 g/l NaHCO₃, w: 1,0 mM pirogronianu sodu (numer artykułu Cytion 820300a)**Supplements** Uzuppełnić podłoże 10% FBS**Dissociation Reagent** Accutase

Komórki HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry | 300919

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.
Split ratio	Zalecany jest stosunek 1:3
Seeding density	1×10^4 komórek/cm ²
Fluid renewal	2 do 3 razy w tygodniu
Post-Thaw Recovery	Po rozmrożeniu umieść komórki na płytce w ilości 5×10^4 komórek/cm ² i pozostaw je na co najmniej 24 godziny, aby mogły się zregenerować po procesie zamrażania i przyłączyć 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.

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

1. Upewnij się, że fiolka pozostaje głęboko zamrożona w momencie dostawy, ponieważ komórki są wysyłane 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 $300 \times g$ 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 zawieszonych, 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.

**Incubation
Atmosphere**

37°C , 5% CO_2 , 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 czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiolki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Komórki HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry | 300919

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.