

Células HK EGFP-alfa-tubulina/H2B-mCherry | 300670**Informações gerais****Description**

A linha celular HK EGFP-alfa-tubulina/H2B-mCherry HeLa Kyoto é um modelo meticulosamente concebido para a visualização pormenorizada dos processos celulares. Esta linha clonal foi transfectada de forma estável para exprimir duas fusões de proteínas fluorescentes que permitem a obtenção de imagens em tempo real da cromatina e da rede microtubular. A proteína fluorescente vermelha mCherry é fundida com a proteína histona central H2B, criando H2B-mCherry. Esta proteína de fusão é expressa a partir do plasmídeo pH2B-mCherry-IRES-neo3 e serve como marcador de cromatina, destacando o ADN nuclear em imagens de células vivas e facilitando estudos sobre a dinâmica da cromatina e a arquitetura nuclear.

Além disso, esta linha celular exprime GFP (Proteína Fluorescente Verde) monomérica melhorada fundida com α -tubulina, introduzida através do plasmídeo pmEGFP- α -tubulina-IRES-puro2b. A fusão GFP- α -tubulina fornece uma fluorescência verde viva que delinea as estruturas dos microtúbulos no interior da célula. Esta característica é crucial para o estudo da organização e dinâmica dos microtúbulos e do seu papel na divisão celular e no transporte intracelular. A integração estável destas construções permite a observação contínua e a longo prazo destes componentes celulares sem a necessidade de transfecção repetida, reduzindo assim a variabilidade e aumentando a fiabilidade dos resultados experimentais. A seleção da resistência aos medicamentos após a transfecção assegura a estabilidade e a uniformidade da expressão entre as células desta linha.

Organism

Humano

Tissue

Colo do útero

Disease

Carcinoma

SynonymsHeLa Kyoto EGFP- α -tubulina/H2B-mCherry, HeLa H2B-mRFP e mEGFP- α -tubulina**Caraterísticas****Age**

30 anos

Gender

Feminino

Ethnicity

Afro-americano

Morphology

Células de tipo epitelial com forma de pedra em mosaico

Growth properties

Monocamada, aderente

Dados regulamentares

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

Citation	HK EGFP-alfa-tubulina/H2B-mCherry (número de catálogo Cytion 300670)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_L802
Depositor	O Laboratório Ellenberg (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Esta linha HeLa Kyoto contém construções EGFP- α -tubulina e H2B-mCherry para imagem simultânea de microtúbulos e cromatina. Esta classificação aplica-se apenas na Alemanha e pode diferir noutros países.

Dados biomoleculares

Protein expression	EGFP-alfa-tubulina, H2B-mCherry: Localização/Gene: 1..589 / Pcmv, 652..1029 H2B, 1042..1752 / mCherry, 2983..3777 / KanR/NeoR
Viruses	Negativo para VIH, VHB e VHC.
Products	Promotor do CMV, Histona H2B, Neomicina, Fosfotransferase

Manuseamento

Culture Medium	DMEM, com: 4,5 g/L de glucose, com: 4 mM de L-Glutamina, com: 3,7 g/L de NaHCO ₃ , com: 1,0 mM de piruvato de sódio (número de artigo Cytion 820300a)
Supplements	Completar o meio com 10% de FBS
Dissociation Reagent	Accutase
Doubling time	24 horas
Subculturing	Retirar o meio antigo das células aderentes e lavá-las com PBS sem cálcio e magnésio. Nos frascos T25, utilizar 3-5 ml de PBS e, nos frascos T75, 5-10 ml. Em seguida, cobrir completamente as células com Accutase, utilizando 1-2 ml para os frascos T25 e 2,5 ml para os frascos T75. Deixar as células incubar à temperatura ambiente durante 8-10 minutos para as destacar. Após a incubação, misturar suavemente as células com 10 ml de meio para as ressuspender e, em seguida, centrifugar a 300xg durante 3 minutos. Deitar fora o sobrenadante, ressuspender as células em meio fresco e transferi-las para novos frascos que já contenham meio fresco.

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

Seeding density 1 x 10⁴ células/cm²

Fluid renewal 2 a 3 vezes por semana

Post-Thaw Recovery Após o descongelamento, coloque as células em placas a uma densidade de 5 x 10⁴ células/cm² e deixe-as recuperar do processo de congelamento e aderir durante pelo menos 24 horas.

Freeze medium Como meio de criopreservação, utilizamos um meio de crescimento completo (incluindo FBS) + 10% DMSO para uma viabilidade pós-descongelamento adequada, ou CM-1 (número de catálogo Cytion 800100), que inclui osmoprotectores otimizados e estabilizadores metabólicos para melhorar a recuperação e reduzir o stress induzido pela crio.

Thawing and Culturing Cells

1. Confirme que o frasco permanece profundamente congelado aquando da entrega, uma vez que as células são enviadas em gelo seco para manter as temperaturas ideais durante o transporte.
2. Após a receção, armazenar o frasco criogénico imediatamente a temperaturas inferiores a -150°C para garantir a preservação da integridade celular, ou avançar para o passo 3 se for necessária uma cultura imediata.
3. Para uma cultura imediata, descongelar rapidamente o frasco imergindo-o num banho de água a 37°C com água limpa e um agente antimicrobiano, agitando suavemente durante 40-60 segundos até ficar um pequeno aglomerado de gelo.
4. Efetuar todos os passos subsequentes em condições estéreis numa capela de fluxo, desinfetando o frasco criogénico com etanol a 70% antes de o abrir.
5. Abrir cuidadosamente o frasco desinfetado e transferir a suspensão de células para um tubo de centrifugação de 15 ml contendo 8 ml de meio de cultura à temperatura ambiente, misturando suavemente.
6. Centrifugar a mistura a 300 x g durante 3 minutos para separar as células e eliminar cuidadosamente o sobrenadante que contém o meio de congelação residual.
7. Ressuspender suavemente o pellet de células em 10 ml de meio de cultura fresco. No caso de células aderentes, dividir a suspensão entre dois frascos de cultura T25; no caso de culturas em suspensão, transferir todo o meio para um frasco T25 para promover uma interação e um crescimento eficazes das células.
8. Cumprir os protocolos de subcultura estabelecidos para o crescimento e manutenção contínuos da linha celular, garantindo resultados experimentais fiáveis.

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

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

Flask Coating Nenhum

Freezing Procedure As linhas celulares criopreservadas são expedidas em gelo seco em embalagens validadas e isoladas com refrigerante suficiente para manter aproximadamente -78 °C durante o transporte. Aquando da receção, inspecionar imediatamente o recipiente e transferir sem demora os frascos para um local de armazenamento adequado.

Shipping Conditions As linhas celulares criopreservadas são expedidas em gelo seco em embalagens validadas e isoladas com refrigerante suficiente para manter aproximadamente -78 °C durante o transporte. Aquando da receção, inspecionar imediatamente o recipiente e transferir sem demora os frascos para um local de armazenamento adequado.

Storage Conditions Para conservação a longo prazo, colocar os frascos em azoto líquido em fase de vapor a uma temperatura entre -150 e -196 °C. O armazenamento a -80 °C é aceitável apenas como um curto passo intermédio antes da transferência para azoto líquido.

Controlo de qualidade / Perfil genético / HLA

Sterility A contaminação por micoplasma é excluída utilizando ensaios baseados em PCR e métodos de deteção de micoplasma baseados em luminescência.

Para garantir que não há contaminação bacteriana, fúngica ou de leveduras, as culturas de células são sujeitas a inspeções visuais diárias.