

Células HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry | 300919**Informações gerais****Description**

A linha celular HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry é um modelo in vitro derivado da HeLa Kyoto, concebido para a visualização em tempo real da dinâmica da cromatina e da arquitetura nuclear em células vivas. Esta linha celular exprime duas fusões de proteínas fluorescentes: EGFP (proteína verde fluorescente melhorada) fundida com Lamin B1, e mCherry (uma proteína vermelha fluorescente) fundida com histona H2B. A fusão de EGFP com Lamin B1 permite a observação do envelope nuclear e da lâmina nuclear, estruturas críticas para a manutenção da integridade e funcionalidade do núcleo. As proteínas lamininas são proteínas de filamento intermédio do tipo V que formam uma malha subjacente à membrana nuclear interna, desempenhando papéis fundamentais na estabilidade nuclear, na organização da cromatina e na regulação dos genes.

Por outro lado, a histona H2B marcada com mCherry permite a visualização da cromatina no interior do núcleo. As histonas são componentes fundamentais do nucleossoma, envolvidas na organização do ADN em cromatina, o que as torna cruciais para a replicação, reparação e transcrição do ADN. A etiqueta mCherry na H2B fornece uma fluorescência vermelha viva que contrasta com a fluorescência verde da EGFP, permitindo a imagem dupla simultânea da estrutura nuclear e da cromatina em experiências com células vivas. Esta linha celular é normalmente utilizada em estudos centrados na mecânica nuclear, mitose e estabilidade do genoma, proporcionando uma visão dinâmica dos processos celulares que, de outro modo, são difíceis de observar em tempo real.

Organism

Humano

Tissue

Colo do útero

Disease

Carcinoma

Metastatic site

Localização do tumor primário (colo do útero)

Applications

Lâmina nuclear e organização da cromatina; dinâmica da lamina B1; imagiologia da cromatina H2B; fluorescência de células vivas em duas cores; mecânica nuclear; mitose; estabilidade do genoma; biologia do envelope nuclear

Synonyms

HeLa Kyoto EGFP-LaminB1 e H2B-mCherry

Caraterísticas**Age**

30 anos

Gender

Feminino

Ethnicity

Afro-americano

Morphology

Células de tipo epitelial com forma de pedra em mosaico

Células HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry | 300919**Cell type** Células epiteliais**Growth properties** Monocamada, aderente**Dados regulamentares****Citation** HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry (número de catálogo Cytion 300919)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_UR41**Depositor** O Laboratório Ellenberg (EMBL)**GMO Status** GMO-S1: Esta linha HeLa Kyoto contém construções EGFP-Lamin B1 e H2B-mCherry para imagem do envelope nuclear e organização da cromatina. Esta classificação aplica-se apenas na Alemanha e pode diferir noutros países.**Dados biomoleculares****Protein expression** EGFP-LaminB1/H2B-mCherry**Products** Histona H2B**Manuseamento****Culture Medium** DMEM, com: 4,5 g/L de glicose, com: 4 mM de L-Glutamina, com: 3,7 g/L de NaHCO₃, com: 1,0 mM de piruvato de sódio (número de artigo Cytion 820300a)**Supplements** Completar o meio com 10% de FBS**Dissociation Reagent** Accutase

Células HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry | 300919

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.

Seeding density 1×10^4 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 5×10^4 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.

Células HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry | 300919

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, desinfectando o frasco criogénico com etanol a 70% antes de o abrir.
5. Abrir cuidadosamente o frasco desinfectado 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 $300 \times g$ 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.

Incubation Atmosphere

37°C , 5% CO_2 , 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.

Células HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry | 300919

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 inspecções visuais diárias.