

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**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**Growth properties** Monocamada, aderente**Dados regulamentares**

Células HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry | 300919**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 glucose, 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**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

Células HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry | 300919

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.

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 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.

Incubation Atmosphere

37°C, 5% CO₂, atmosfera humidificada.

Flask Coating

Nenhum

Células HK EGFP-LaminB1/H2B-mCherry | 300919

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.