

**HK EGFP-alfa-tubulin/H2B-mCherry-celler | 300670****Allmän information****Description**

HK EGFP-alfa-tubulin/H2B-mCherry HeLa Kyoto-cellinjen är en noggrant konstruerad modell som är utformad för detaljerad visualisering av cellulära processer. Denna klonala linje har transfekterats stabilt för att uttrycka två fluorescerande proteinfusioner som möjliggör realtidsavbildning av både kromatin och det mikrotubulära nätverket. Det röda fluorescerande proteinet mCherry är fusionerat med kärnhistonproteinet H2B, vilket ger H2B-mCherry. Detta fusionsprotein uttrycks från plasmiden pH2B-mCherry-IRES-neo3 och fungerar som en kromatinmarkör som framhäver kärn-DNA i live-cellavbildning och underlättar studier av kromatindynamik och kärnarkitektur.

Dessutom uttrycker denna cellinje monomer förstärkt GFP (Green Fluorescent Protein) fusionerat med  $\alpha$ -tubulin, introducerat via pmEGFP- $\alpha$ -tubulin-IRES-puro2b-plasmiden. GFP- $\alpha$ -tubulinfusionen ger en livlig grön fluorescens som beskriver mikrotubulstrukturerna i cellen. Denna funktion är avgörande för att studera mikrotubulernas organisation och dynamik samt deras roll i celldelning och intracellulär transport. Den stabila integrationen av dessa konstruktioner möjliggör kontinuerlig och långsiktig observation av dessa cellulära komponenter utan behov av upprepade transfektioner, vilket minskar variabiliteten och ökar tillförlitligheten i experimentresultaten. Val av läkemedelsresistens efter transfektion säkerställer stabilitet och enhetlighet i uttrycket bland cellerna i denna linje.

**Organism** Människan

**Tissue** Cervix

**Disease** Carcinom

**Synonyms** HeLa Kyoto EGFP- $\alpha$ -tubulin/H2B-mCherry, HeLa H2B-mRFP och mEGFP-alfa-tubulin

**Egenskaper**

**Age** 30 år

**Gender** Kvinna

**Ethnicity** Afroamerikan

**Morphology** Epitelliknande celler med mosaikstensform

**Growth properties** Monolager, vidhäftande

**Lagstadgade uppgifter**

**HK EGFP-alfa-tubulin/H2B-mCherry-celler | 300670**

<b>Citation</b>	HK EGFP-alfa-tubulin/H2B-mCherry (Cytion katalognummer 300670)
<b>Biosafety level</b>	1
<b>NCBI_TaxID</b>	9606
<b>CellosaurusAccession</b>	CVCL_L802
<b>Depositor</b>	Ellenberg-laboratoriet (EMBL)
<b>GMO Status</b>	GMO-S1: Denna HeLa Kyoto-linje innehåller EGFP- $\alpha$ -tubulin- och H2B-mCherry-konstruktioner för samtidig avbildning av mikrotubuli och kromatin. Denna klassificering gäller endast inom Tyskland och kan skilja sig åt på andra håll.

**Biomolekylära data**

<b>Protein expression</b>	EGFP-alfa-tubulin, H2B-mCherry: Ort/Gen: 1..589 / Pcmv, 652..1029 H2B, 1042..1752 / mCherry, 2983..3777 / KanR/NeoR
<b>Viruses</b>	Negativt för HIV, HBV och HCV.
<b>Products</b>	CMV Promotor, Histon H2B, Neomycin, Fosfotransferas

**Hantering**

<b>Culture Medium</b>	DMEM, w: 4,5 g/L glukos, w: 4 mM L-glutamin, w: 3,7 g/L NaHCO <sub>3</sub> , w: 1,0 mM natriumpyruvat (Cytion artikelnummer 820300a)
<b>Supplements</b>	Komplettera mediet med 10% FBS
<b>Dissociation Reagent</b>	Accutase
<b>Doubling time</b>	24 timmar
<b>Subculturing</b>	Ta bort det gamla mediet från de adherenta cellerna och tvätta dem med PBS som saknar kalcium och magnesium. Använd 3-5 ml PBS för T25-kolvar och 5-10 ml för T75-kolvar. Täck sedan cellerna helt med Accutase, använd 1-2 ml för T25-kolvar och 2,5 ml för T75-kolvar. Låt cellerna inkubera i rumstemperatur i 8-10 minuter så att de lossnar. Efter inkubationen, blanda cellerna försiktigt med 10 ml medium för att resuspendera dem och centrifugera sedan vid 300xg i 3 minuter. Kassera supernatanten, resuspendera cellerna i färskt medium och överför dem till nya kolvar som redan innehåller färskt medium.

**HK EGFP-alfa-tubulin/H2B-mCherry-celler | 300670**

**Split ratio** Ett förhållande på 1:3 rekommenderas

**Seeding density**  $1 \times 10^4$  celler/cm<sup>2</sup>

**Fluid renewal** 2 till 3 gånger per vecka

**Post-Thaw Recovery** Efter upptining, plattlägg cellerna med  $5 \times 10^4$  celler/cm<sup>2</sup> och låt cellerna återhämta sig från frysprocessen och fästa i minst 24 timmar.

**Freeze medium** Som kryokonservationsmedium använder vi komplett tillväxtmedium (inklusive FBS) + 10% DMSO för adekvat viabilitet efter upptining, eller CM-1 (Cytion katalognummer 800100), som innehåller optimerade osmoprotektanter och metaboliska stabilisatorer för att förbättra återhämtningen och minska kryoinducerad stress.

**Thawing and Culturing Cells**

1. Bekräfta att flaskan är djupfrys vid leverans, eftersom cellerna skickas på torris för att bibehålla optimala temperaturer under transporten.
2. Vid mottagandet ska du antingen förvara kryovialen omedelbart vid temperaturer under -150 °C för att säkerställa att cellernas integritet bevaras, eller gå vidare till steg 3 om omedelbar odling krävs.
3. Vid omedelbar odling ska injektionsflaskan snabbt tinas genom att den sänks ned i ett 37 °C vattenbad med rent vatten och ett antimikrobiellt medel och omrörs försiktigt i 40-60 sekunder tills en liten isklump återstår.
4. Utför alla efterföljande steg under sterila förhållanden i en flödeshuv och desinficera kryovialerna med 70 % etanol innan de öppnas.
5. Öppna försiktigt den desinficerade flaskan och överför cellsuspensionen till ett 15 ml centrifugrör som innehåller 8 ml rumstempererat odlingsmedium och blanda försiktigt.
6. Centrifugera blandningen vid 300 x g i 3 minuter för att separera cellerna och kassera försiktigt supernatanten som innehåller resterande frysmedium.
7. Resuspendera försiktigt cellpelleten i 10 ml färskt odlingsmedium. För adherenta celler, fördela suspensionen mellan två T25-kulturkanter; för suspensionskulturer, överför allt medium till en T25-kolv för att främja effektiv cellinteraktion och tillväxt.
8. Följ fastställda subkulturprotokoll för fortsatt tillväxt och underhåll av cellinjen, vilket säkerställer tillförlitliga experimentella resultat.

## HK EGFP-alfa-tubulin/H2B-mCherry-celler | 300670

**Incubation Atmosphere** 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ , befuktad atmosfär.

**Flask Coating** Ingen

**Freezing Procedure** Kryopreserverade cellinjer skickas på torris i validerade, isolerade förpackningar med tillräckligt med kylmedel för att hålla cirka -78 °C under hela transporten. Vid mottagandet ska behållaren omedelbart inspekteras och flaskorna utan dröjsmål överförs till lämplig förvaring.

**Shipping Conditions** Kryopreserverade cellinjer skickas på torris i validerade, isolerade förpackningar med tillräckligt med kylmedel för att hålla cirka -78 °C under hela transporten. Vid mottagandet ska behållaren omedelbart inspekteras och flaskorna utan dröjsmål överförs till lämplig förvaring.

**Storage Conditions** För långtidsförvaring, placera flaskorna i flytande kväve i ångfas vid ca -150 till -196 °C. Förvaring vid -80 °C är acceptabelt endast som ett kort mellanliggande steg innan överföring till flytande kväve.

## Kvalitetskontroll / Genetisk profil / HLA

**Sterility** Mykoplasmakontaminering utesluts med hjälp av både PCR-baserade analyser och luminiscensbaserade metoder för mykoplasmadiagnostik.

För att säkerställa att det inte finns någon kontaminering av bakterier, svamp eller jäst utsätts cellkulturerna för dagliga visuella inspektioner.