

Bunky HK EGFP-alfa-tubulín/H2B-mCherry | 300670**Všeobecné informácie****Description**

Bunková línia HK EGFP-alfa-tubulín/H2B-mCherry HeLa Kyoto je starostlivo navrhnutý model určený na podrobnú vizualizáciu bunkových procesov. Táto klonálna línia bola stabilne transfekovaná na expresiu dvoch fluorescenčných proteínových fúzií, ktoré umožňujú zobrazovanie chromatinu a mikrotubulárnej siete v reálnom čase. Červený fluorescenčný proteín mCherry sa spája s hlavným histónovým proteínom H2B, čím vzniká H2B-mCherry. Tento fúzny proteín sa exprimuje z plazmidu pH2B-mCherry-IRES-neo3 a slúži ako chromatinový marker, ktorý zvýrazňuje jadrovú DNA pri zobrazovaní živých buniek a uľahčuje štúdie dynamiky chromatinu a jadrovej architektúry.

Okrem toho táto bunková línia exprimuje monomérené zosilnený GFP (zelený fluorescenčný proteín) fúzovaný s α -tubulínom, zavedený prostredníctvom plazmidu pmEGFP- α -tubulín-IRES-puro2b. Fúzia GFP- α -tubulínu poskytuje žiarivú zelenú fluorescenciu, ktorá obkresluje mikrotubulárne štruktúry v bunke. Táto vlastnosť je kľúčová pre štúdium organizácie mikrotubulov, ich dynamiky a úlohy pri delení buniek a vnútrobunkovom transporte. Stabilná integrácia týchto konštruktov umožňuje nepretržité, dlhodobé pozorovanie týchto bunkových zložiek bez potreby opakovanej transfekcie, čím sa znižuje variabilita a zvyšuje spoľahlivosť experimentálnych výsledkov. Selekcia liekovej rezistencie po transfekcii zabezpečuje stabilitu a jednotnosť expresie medzi bunkami tejto línie.

Organism

Ľudské

Tissue

Cervix

Disease

Karcinóm

SynonymsHeLa Kyoto EGFP- α -tubulín/H2B-mCherry, HeLa H2B-mRFP a mEGFP-alfa-tubulín**Charakteristika****Age**

30 rokov

Gender

Ženy

Ethnicity

Afroameričan

Morphology

Epitelové bunky s mozaikovým tvarom kameňa

Growth properties

Monovrstva, priliehajúca

Regulačné údaje

Bunky HK EGFP-alfa-tubulín/H2B-mCherry | 300670

Citation	HK EGFP-alfa-tubulín/H2B-mCherry (katalógové číslo Cytion 300670)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_L802
Depositor	Ellenbergova laboratória (EMBL)
GMO Status	GMO-S1: Táto línia HeLa Kyoto obsahuje konštrukty EGFP- α -tubulín a H2B-mCherry pre simultánne zobrazovanie mikrotubulov a chromatinu. Táto klasifikácia platí iba v Nemecku a v iných krajinách sa môže líšiť.

Biomolekulárne údaje

Protein expression	EGFP-alfa-tubulín, H2B-mCherry: Umiestnenie/gén: 1..589 / Pcmv, 652..1029 H2B, 1042..1752 / mCherry, 2983..3777 / KanR/NeoR
Viruses	Negatívne na HIV, HBV a HCV.
Products	CMV promotor, histón H2B, neomycín, fosfotransferáza

Spracovanie

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/l glukózy, w: 4 mM L-glutamínu, w: 3,7 g/l NaHCO ₃ , w: 1,0 mM pyruvátu sodného (číslo výrobku Cytion 820300a)
Supplements	Doplňte médium o 10 % FBS
Dissociation Reagent	Accutase
Doubling time	24 hodín
Subculturing	Odstráňte staré médium z adherovaných buniek a premyte ich PBS, ktorý neobsahuje vápnik a horčík. Pre banky T25 použite 3 - 5 ml PBS a pre banky T75 použite 5 - 10 ml. Potom bunky úplne pokryte Accutase, pričom použite 1 - 2 ml pre banky T25 a 2,5 ml pre banky T75. Nechajte bunky inkubovať pri izbovej teplote 8-10 minút, aby sa oddelili. Po inkubácii jemne premiešajte bunky s 10 ml média, aby boli znovu suspendované, a potom ich 3 minúty odstredujte pri 300xg. Supernatant zlikvidujte, bunky znovu rozmiešajte v čerstvom médiu a preneste ich do nových fliaš, ktoré už obsahujú čerstvé médium.

Bunky HK EGFP-alfa-tubulín/H2B-mCherry | 300670

Seeding density 1 x 10⁴ buniek/cm²

Fluid renewal 2 až 3-krát týždenne

Post-Thaw Recovery Po rozmrazení naneste bunky v koncentrácii 5 x 10⁴ buniek/cm² a nechajte bunky zotaviť sa z procesu zmrazenia a prilnúť aspoň 24 hodín.

Freeze medium Ako kryokonzervačné médium používame kompletne rastové médium (vrátane FBS) + 10 % DMSO na zabezpečenie primeranej životaschopnosti po rozmrazení alebo CM-1 (katalógové číslo 800100 spoločnosti Cytion), ktoré obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory na zlepšenie regenerácie a zníženie stresu spôsobeného kryom.

Thawing and Culturing Cells

1. Overte si, že injekčná liekovka zostane pri doručení hlboko zmrazená, pretože bunky sa prepravujú na suchom ľade, aby sa počas prepravy udržala optimálna teplota.
2. Po prijatí buď okamžite uskladnite kryovialku pri teplote nižšej ako -150 °C, aby ste zabezpečili zachovanie bunkovej integrity, alebo prejdite na krok 3, ak je potrebná okamžitá kultivácia.
3. V prípade okamžitej kultivácie injekčnú liekovku rýchlo rozmrazte ponorením do vodného kúpeľa s teplotou 37 °C s čistou vodou a antimikrobiálnym prostriedkom, pričom ju jemne miešajte 40 - 60 sekúnd, kým nezostane malý ľadový chumáč.
4. Všetky ďalšie kroky vykonajte v sterilných podmienkach v prietokovom digestore a pred otvorením kryovialku dezinfikujte 70 % etanolom.
5. Opatrne otvorte dezinfikovanú fľaštičku a preneste bunkovú suspenziu do 15 ml centrifugačnej skúmavky obsahujúcej 8 ml kultivačného média s izbovou teplotou a jemne premiešajte.
6. Zmes odstreďujte pri 300 x g počas 3 minút, aby sa bunky oddelili, a opatrne zlikvidujte supernatant obsahujúci zvyšky zmrazovacieho média.
7. Pelet buniek jemne resuspendujte v 10 ml čerstvého kultivačného média. V prípade adherentných buniek rozdeľte suspenziu medzi dve kultivačné banky T25; v prípade suspenzných kultúr preneste všetko médium do jednej banky T25, aby ste podporili účinnú interakciu a rast buniek.
8. Dodržiavajte zavedené subkultivačné protokoly na nepretržitý rast a udržiavanie bunkovej línie, čím sa zabezpečia spoľahlivé výsledky experimentov.

Incubation Atmosphere 37 °C, 5 % CO₂, zvlhčená atmosféra.

Bunky HK EGFP-alfa-tubulín/H2B-mCherry | 300670

Flask Coating Žiadne

Freezing Procedure

Kryokonzervované bunkové línie sa prepravujú na suchom ľade v overených, izolovaných obaloch s dostatočným množstvom chladiva na udržanie teploty približne -78 °C počas celej prepravy. Po prijatí ihneď skontrolujte obal a bezodkladne premiestnite injekčné liekovky do vhodného skladu.

Shipping Conditions

Kryokonzervované bunkové línie sa prepravujú na suchom ľade v overených, izolovaných obaloch s dostatočným množstvom chladiva na udržanie teploty približne -78 °C počas celej prepravy. Po prijatí ihneď skontrolujte obal a bezodkladne premiestnite injekčné liekovky do vhodného skladu.

Storage Conditions

Na dlhodobé uchovávanie umiestnite injekčné liekovky do kvapalnej fázy dusíka v pare pri teplote približne -150 až -196 °C. Skladovanie pri teplote -80 °C je prijateľné len ako krátky prechodný krok pred presunom do tekutého dusíka.

Kontrola kvality / Genetický profil / HLA

Sterility

Kontaminácia mykoplazmami sa vylučuje pomocou testov založených na PCR a metód detekcie mykoplaziem založených na luminiscencii.

Aby sa zabezpečilo, že nedošlo ku kontaminácii baktériami, hubami alebo kvasinkami, bunkové kultúry sa denne vizuálne kontrolujú.