

HeLa Kyoto Mad2-LAP/H2B-mCherry Lebendkultur | 330920

Allgemeine Informationen

Description Diese klonale stabile Zelllinie wurde durch Transfektion eines zirkulären Plasmids und anschließende Selektion auf Arzneimittelresistenz erzeugt. Die HeLa-Kyoto-Mad2-LAP/H2B-mCherry-Zellen, die durch die Integration eines Plasmids mit der markierten Zielgenesequenz in einen nicht endogenen Locus entstanden sind, können bei längerer Vermehrung in der Kultur Variegation oder Heterogenität aufweisen. Heterogenität im Laufe der Zeit kann ein plausibles Ergebnis sein. Um dieses Problem abzuschwächen, wird ein selektives Wachstum dieser Zellen empfohlen, und wenn die Heterogenität fortbesteht, kann die Zellqualität durch FACS zur Selektion der markierten Population verbessert werden.

Organism Menschen

Tissue Gebärmutterhals

Disease Karzinom

Synonyms HeLa Kyoto Mad2-LAP und H2B-mCherry, HeLa Kyoto Mad2-LAP

Merkmale

Age 30 Jahre

Gender Weiblich

Ethnicity Afroamerikaner

Morphology Epithelähnliche Zellen mit mosaikartiger Steinform

Growth properties Monolayer, anhaftend

Identifikatoren / Biologische Schutzstufe / Zitation

Citation HeLa Kyoto Mad2-LAP/H2B-mCherry (Cytion Katalognummer 300920)

Biosafety level 1

Depositor Dr. J. Ellenberg, EMBL Heidelberg

Expression / Mutation

HeLa Kyoto Mad2-LAP/H2B-mCherry Lebendkultur | 330920

Protein expression	Mad2-LAP/H2B-mCherry
---------------------------	----------------------

Handhabung

Culture Medium	DMEM
-----------------------	------

Medium supplements	10% FBS, w: 4,5 g/L Glucose, w: 4 mM L-Glutamin, w: 1,5 g/L NaHCO ₃ , w: 1,0 mM Natriumpyruvat
---------------------------	---

Passaging solution	Accutase
---------------------------	----------

Subculturing	Medium entfernen und die anhaftenden Zellen mit PBS ohne Kalzium und Magnesium spülen (3-5 ml PBS für T25-, 5-10 ml für T75-Zellkulturflaschen). Accutase zugeben (1-2 ml pro T25-, 2,5 ml pro T75-Zellkulturflasche), die Zellschicht muss vollständig bedeckt sein. Bei Raumtemperatur 8-10 Minuten lang inkubieren. Die Zellen vorsichtig mit Medium (10 ml) resuspendieren, 3 Minuten bei 300xg zentrifugieren, die Zellen in frischem Medium resuspendieren und in neue Flaschen mit frischem Medium geben.
---------------------	--

Split ratio	Empfohlen wird ein Verhältnis von 1:3
--------------------	---------------------------------------

Seeding density	1 x 10 ⁴ Zellen/cm ²
------------------------	--

Fluid renewal	2 bis 3 Mal pro Woche
----------------------	-----------------------

Freezing recovery	Nach dem Auftauen die Zellen mit 5 x 10 ⁴ Zellen/cm ² plattieren und die Zellen mindestens 24 Stunden lang vom Gefrierprozess erholen und anhaften lassen.
--------------------------	--

Freeze medium	CM-1 (Cytion Katalognummer 800100) oder CM-ACF (Cytion Katalognummer 806100)
----------------------	--

HeLa Kyoto Mad2-LAP/H2B-mCherry Lebendkultur | 330920

Handling of cryopreserved cultures

Die Zellen werden tiefgefroren auf Trockeneis versandt. Bitte stellen Sie sicher, dass das Fläschchen noch gefroren ist. Wenn eine sofortige Kultivierung nicht beabsichtigt ist, muss das Kryovial nach der Ankunft unter -150 Grad Celsius gelagert werden. Wenn eine sofortige Kultivierung beabsichtigt ist, befolgen Sie bitte die nachstehenden Anweisungen: Schnelles Auftauen durch schnelles Schütteln in einem 37 Grad Celsius warmen Wasserbad innerhalb von 40-60 Sekunden. Das Wasserbad sollte sauberes Wasser enthalten, das ein antimikrobielles Mittel enthält. Sobald die Probe aufgetaut ist, nehmen Sie das Kryovial aus dem Wasserbad. Es sollte noch ein kleiner Eisklumpen zurückbleiben und das Fläschchen sollte noch kalt sein. Von nun an sollten alle Operationen unter aseptischen Bedingungen durchgeführt werden. Überführen Sie das Kryovial in einen sterilen Durchflussschrank und wischen Sie es mit 70%igem Alkohol ab. Das Fläschchen vorsichtig öffnen und die Zellsuspension in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit 8 ml Kulturmedium (Raumtemperatur) überführen. Die Zellen vorsichtig resuspendieren. Zentrifugieren Sie bei 300 x g für 3 Minuten und werfen Sie den Überstand. Der Zentrifugationsschritt kann ausgelassen werden, aber in diesem Fall müssen die Reste des Gefriermediums 24 Stunden später entfernt werden. Die Zellen vorsichtig in 10 ml frischem Zellkulturmedium resuspendieren und in zwei T25-Zellkulturflaschen überführen. Alle weiteren Schritte sind im Abschnitt Subkultur beschrieben.

Handling of proliferating cultures

Eine oder zwei Zellkulturflaschen werden mit Zellkulturmedium gefüllt. Fangen Sie das gesamte Medium in 1 bzw. 2 x 50 ml Zentrifugenröhrchen auf. Geben Sie vorsichtig 5 ml Zellkulturmedium in jede T25-Zellkulturflasche. Kontrollieren Sie die Zellmorphologie und den Konfluenzgrad unter dem Mikroskop. Mindestens 24 Stunden lang bei 37 Grad Celsius inkubieren. Schleudern Sie das gesammelte Medium 3 Minuten lang bei 300 x g, um die Zellen zu sammeln, die sich während des Transports abgelöst haben könnten. Wenn ein Zellpellet sichtbar ist, die Zellen in 5 ml Zellkulturmedium resuspendieren und in eine T25-Zellkulturflasche überführen. Bei 37 Grad Celsius mindestens 24 Stunden lang bebrüten.

Qualitätskontrolle / Genetisches Profil / HLA

Sterility

Mykoplasmen-Kontaminationen werden durch PCR- und Lumineszenz-basierte Mykoplasmen-Assays ausgeschlossen. Das Nichtvorhandensein von Bakterien-, Pilz- oder Hefekontaminationen wird durch tägliche visuelle Zellüberwachung kontrolliert.