Product sheet

Клетки NCI-H1299-RFP | 300272

Обща информация

Description	Клетките NCI-H1299 RFP, модифицирани така, че да включват репортер в гена DAPK1, са полезни не само за изучаване на специфичната генна активация, но и за по-широко разбиране на това как клетките реагират на епигенетичните лекарства в световен мащаб. С помощта на техника, наречена Cap Analysis of Gene Expression (CAGE), изследователите са успели да опишат подробно промените в местата, където започва транскрипцията в генома, в отговор на лечение с DNMTi (DAC), HDACi (SAHA или SB939) или техните комбинации. Този метод разкрива не само очакваното реактивиране на гена DAPK1, но и появата на нови места за начало на транскрипцията, наречени неанотирани TSSs (TINATs), предизвикани от лечението, особено при лечение с лекарства. Тези нови начални места обикновено се намират в области на генома, които обикновено не произвеждат протеини, и водят до създаването на нови РНК молекули, които потенциално биха могли да кодират протеини. По-нататъшният анализ показва, че тези нови РНК молекули понякога могат да се слеят със съществуващи молекули и да образуват т.нар. транскрипти на сливане на TINAT и екзони. В зависимост от това как тези транскрипти се сплитат, те могат да се превърнат в нови, нетипични протеини. Този процес е потвърден чрез лабораторни техники, които показват, че тези транскрипти наистина могат да доведат до производството на нови протеинови форми. Тези белтъци могат да взаимодействат необичайно в клетката или да бъдат разпознати като чужди от имунната система, като потенциално предлагат нови цели за терапия на рака. Активирането на тези ТИНАТ включва сложни промени както в метилирането на ДНК, така и в модификациите на хистоните, което илюстрира сложното взаимодействие между тези епигенетични фактори при лечение с лекарства. По-специално, комбинираното използване на DAC и SB939 показва по-голям ефект, като повишава експресията на тези нови транскрипти повече, отколкото когато всяко от лекарствата се използва самостоятелно. Разбирането на тези взаимодействия и техните резултати помага да се изясни как епигенетичните терапии променят поведението на клетките и открива възможности за нови лечения на рака, които използват тези сложни молекулярни промени.
Organism	Човек
Tissue	Бял дроб
Disease	Голямоклетъчен карцином
Metastatic site	Място на първичния тумор (белодробен)
Applications	Изследвания в областта на епигенетичната терапия; реактивиране на гена DAPK1; проучвания на реакцията към лекарства от типа DNMTi и HDACi; неаннотирани TSS, индуцирани от лечението (TINAT); транскриптомика чрез CAGE; анализ на фузионни транскрипти; синтез на атипични протеини от криптични промотори; скрининг на епигенетични комбинации от лекарства

Характеристики

Morphology	Подобни на епител

Клетки NCI-H1299-RFP | 300272

Cell type	Епителни клетки
Growth properties	Придържащи се

Регулаторни данни

Citation	NCI-H1299-EGFP, с резистентност към G418 и заглушен репортер (DKFZ # P-1045) (каталожен номер на Cytion 300272)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_XB25
GMO Status	GMO-S1: Това производно на NCI-H1299 (DKFZ #P-1045) съдържа стабилно потиснат EGFP-репортер в локуса на DAPK1, което позволява отчитане на епигенетичната реактивация. Налична е касета за резистентност към G418. Тази класификация важи само в Германия и може да се различава в други страни.

Биомолекулярни данни

Работа с

Culture Medium	RPMI 1640, w: 2,0 mM стабилен глутамин, w: 2,0 g/L NaHCO3 (номер на статията в Cytion 820700a)
Supplements	Допълнете средата с 10% FBS
Dissociation Reagent	Accutase
Doubling time	приблизително 24 до 36 часа
Subculturing	Отстранете старата среда от адхезивните клетки и ги промийте с PBS, която не съдържа калций и магнезий. За колби T25 използвайте 3-5 ml PBS, а за колби T75 - 5-10 ml. След това покрийте клетките изцяло с Accutase, като използвате 1-2 ml за колби T25 и 2,5 ml за колби T75. Оставете клетките да се инкубират на стайна температура за 8-10 минути, за да се отделят. След инкубацията внимателно разбъркайте клетките с 10 ml среда, за да ги ресуспендирате, след което центрофугирайте при 300xg за 3 минути. Изхвърлете супернатантата, ресуспендирайте клетките в прясна среда и ги прехвърлете в нови колби, които вече съдържат прясна среда.

Клетки NCI-H1299-RFP | 300272

Split ratio	от 1 до 5
Seeding density	от 1 до 3 × 10^4 клетки/$см^2$
Fluid renewal	2 до 3 пъти седмично
Freeze medium	Като среда за криоконсервация използваме пълна среда за растеж (включително FBS) + 10% DMSO за адекватна жизнеспособност след размразяване или CM-1 (каталожен номер 800100 на Cytion), която включва оптимизирани осмопротектори и метаболитни стабилизатори за подобряване на възстановяването и намаляване на криоиндуцирания стрес.

Thawing and Culturing Cells

1. Уверете се, че флаконът остава дълбоко замразен при доставката, тъй като клетките се транспортират със сух лед, за да се поддържат оптимални температури по време на транспортирането.

2. При получаване или съхранявайте незабавно криовиолата при температури под -150 °C, за да осигурите запазване на клетъчната цялост, или преминете към стъпка 3, ако е необходимо незабавно култивиране.

3. За незабавно култивиране бързо размразете флакона, като го потопите във водна баня с чиста вода и антимикробен агент с температура 37 °C, като разбърквате внимателно в продължение на 40-60 секунди, докато остане малка ледена бучка.

4. Извършвайте всички следващи стъпки при стерилни условия в аспиратор, като преди отваряне дезинфекцирате криовиолата със 70% етанол.

5. Внимателно отворете дезинфекцирания флакон и прехвърлете клетъчната суспензия в 15 ml центрофужна епруветка, съдържаща 8 ml хранителна среда със стайна температура, като разбъркате внимателно.

6. Центрофугирайте сместа при 300 x g в продължение на 3 минути, за да отделите клетките, и внимателно изхвърлете супернатантата, съдържаща остатъчна замразяваща среда.

7. Внимателно ресуспендирайте клетъчната пелета в 10 ml прясна хранителна среда. За адхезивни клетки разделете суспензията между две колби T25; за суспензионни култури прехвърлете цялата среда в една колба T25, за да стимулирате ефективното взаимодействие и растеж на клетките.

8. Придържайте се към установените протоколи за субкултивиране за непрекъснат растеж и поддържане на клетъчната линия, като гарантирате надеждни експериментални резултати.

Клетки NCI-H1299-RFP | 300272

Incubation Atmosphere	37°C, 5%$_{CO2}$, овлажнена атмосфера.
Flask Coating	Няма
Freezing Procedure	Криоконсервираните клетъчни линии се транспортират върху сух лед във валидирана, изолирана опаковка с достатъчно хладилен агент, за да се поддържа приблизително -78 °C по време на транспортирането. При получаването незабавно прегледайте опаковката и незабавно прехвърлете флаконите за подходящо съхранение.
Shipping Conditions	Криоконсервираните клетъчни линии се транспортират върху сух лед във валидирана, изолирана опаковка с достатъчно хладилен агент, за да се поддържа приблизително -78 °C по време на транспортирането. При получаването незабавно прегледайте опаковката и незабавно прехвърлете флаконите за подходящо съхранение.
Storage Conditions	За дълготрайно съхранение поставете флаконите в течен азот в парна фаза при температура около -150 до -196 °C. Съхранението при -80 °C е приемливо само като кратък междинен етап преди прехвърлянето в течен азот.

Контрол на качеството и молекулярен анализ

Sterility	Замърсяването с микоплазма се изключва както чрез PCR-базирани анализи, така и чрез луминесцентни методи за откриване на микоплазма. За да се гарантира, че няма бактериално, гъбично или дрождево замърсяване, клетъчните култури се подлагат на ежедневни визуални проверки.