

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 Голямклетъчен карцином

Характеристики

Morphology Подобни на епител

Growth properties Придържащи се

Регулаторни данни

Клетки NCI-H1299-RFP | 300272

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

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

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.

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.

Клетки NCI-H1299-RFP | 300272

**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 $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 антимикуробен агент с температура $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 разбърквате 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.

**Incubation
Atmosphere**

37°C , 5% CO_2 , 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 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ по време на транспортирането. При получаването незабавно прегледайте опаковката и незабавно прехвърлете флаконите за подходящо съхранение.

Клетки NCI-H1299-RFP | 300272

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 / Генетичен профил / HLA

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.