

Клетки HaCaT-ras A5 | 300494

Обща информация

Description

Клетките HaCaT-ras A5 са спонтанно имортизирана, нетуморогенна клетъчна линия от човешки кожни кератиноцити, която е от съществено значение за изследването на взаимодействията на туморната среда и прогресията на кожния карцином. Тези клетки, произхождащи от 62-годишен мъж от Кавказ, са подложени на клонова селекция и мутагенеза, които в съчетание с автокринната регулация на растежните фактори позволяват образуването на бавно растящи, високодиференцирани доброкачествени кистозни тумори в мишки Balb/c-nu/nu. Това ги прави ценен модел за изследване на клетъчната динамика и молекулярните механизми на туморната прогресия *in vivo*.

Клетките HaCaT-ras A5 са особено полезни за изясняване на сложните взаимодействия между туморните клетки и заобикалящите ги стромални клетки, включително фибробласти, имунни клетки и ендотелни клетки. Тези взаимодействия се опосредстват от секрецията на различни сигнални молекули, като растежни фактори, цитокини и протеази, сред които интерлевкин-6 (IL-6) играе ключова роля. Известно е, че IL-6 се дисрегулира при много видове рак, главно чрез свръхекспресия или постоянно активиране на транскрипционния фактор STAT3.

Изследванията показват, че стимулирането с IL-6 на HaCaT-ras A5 клетки значително увеличава тяхната пролиферация чрез JAK/STAT сигналния път, докато фибробластите остават незасегнати поради силното инхибиране от SOCS3, отрицателен регулатор на този път. Тази диференцирана реакция е отразена в математически модел, описващ динамиката на STAT3 и SOCS3, което осигурява по-дълбоко разбиране на специфичните за клетките сигнални каскади.

Освен това IL-6 не само влияе пряко върху пролиферацията на клетките HaCaT-ras A5, но и косвено върху клетъчната среда чрез активиране на мрежа от растежни фактори като HGF, KGF, VEGF и IL-8. Анализът на генната експресия, включващ над 16 000 гена, разкрива, че стимулацията с IL-6 повишава регулацията на 19 гена, свързани с интерфероновия сигнален път, както в клетките HaCaT-ras A5, така и във фибробластите, което корелира с наблюдаваното инхибиране на растежа във фибробластите.

Откриването на решаващата роля на SerpinB4 за пролиферацията на клетките HaCaT-ras A5, потвърдено чрез експерименти с нокдаун на siRNA, подчертава сложната регулация от IL-6 както в туморните, така и в стромалните клетки. Това цялостно разбиране на ролята на IL-6 увеличава потенциала за разработване на целеви терапевтични стратегии, насочени към модулиране на сигналните пътища на IL-6 в туморната среда.

Като цяло клетките HaCaT-ras A5 предлагат надежден модел за изследване на сложното взаимодействие в туморната среда, проправяйки пътя за нови подходи в изследванията на рака и разработването на терапии.

Organism Човек

Tissue Кожа

Synonyms HaCaT-ras клонинг A-5, HaCaT A-5, A-5, A5

Характеристики

Клетки HaCaT-ras A5 | 300494

Age	62 години
Gender	Мъжки
Ethnicity	Кавказки
Cell type	Кератиноцити
Growth properties	Придържачи се

Регулаторни данни

Citation	HaCaT-ras A5 (каталожен номер 300494 на Cytion)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_xK16
GMO Status	GMO-S1: Тази линия HaCaT-ras A5 съдържа плазмиден конструкт на онкоген с-Ha-ras за изследване на епителната трансформация. Тази класификация се прилага само в Германия и може да се различава в други страни.

Биомолекулярни данни

Protein expression	P53 (+), CEA (+),
Tumorigenic	Образуване на доброкачествени тумори при мишки Balb/c-nu/nu.
Karyotype	Анеуплоидни (хипотетраплоидни)

Работа с

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/L глюкоза, w: 4 mM L-глутамин, w: 3,7 g/L NaHCO ₃ , w: 1,0 mM натриев пируват (номер на изделието на Cytion 820300a)
Supplements	Допълнете средата с 10% FBS

Клетки HaCaT-ras A5 | 300494**Dissociation Reagent**

Сместа 1:1 от EDTA (запас 0,05%) и трипсин (запас 0,1%) трябва да се приготвя всеки път преди отделянето на клетките, като се използва PBS без Ca²⁺ и Mg²⁺, за да се осигури физиологичен осмоларитет. Не се препоръчват готови за употреба смеси от трипсин/EDTA, тъй като това може да доведе до струпване на клетки. Като алтернатива може да се използва TrypLETM Express (Life Technologies) вместо трипсин/EDTA. Трябва да се спазва протоколът на производителя.

Subculturing

1. **Изхвърлете стария носител:** Отстранете старата среда от колбите.
2. **Измиете клетките:** Добавете 3-5 ml PBS (без калций и магнезий) в колби T25 или 5-10 ml в колби T75, за да измиете адхезираните клетки.
3. **Добавете разтвор на EDTA:** Покрийте изцяло клетъчния слой с прясно приготвен 0,05% разтвор на EDTA - използвайте 1-2 ml за колби T25 и 2,5 ml за колби T75.
4. **Инкубиране:** Инкубирайте колбите при 37 градуса по Целзий за 10 минути.
5. **Добавете разтвор на трипсин/EDTA:** След инкубацията добавете прясно приготвен разтвор на трипсин/EDTA (0,05 % трипсин, 0,025 % EDTA) към колбите, като се уверите, че клетките са напълно покрити - използвайте 1 ml за колби T25 и 2,5 ml за колби T75.
6. **Наблюдавайте отделянето:** Наблюдавайте клетките, които трябва да се отделят в рамките на 1-2 минути.
7. **Неутрализирайте трипсина:** Добавете среда за клетъчна култура, съдържаща FBS, за да спрете активността на трипсина.
8. **Прехвърлете клетките:** Прехвърлете клетъчната суспензия в нови колби, предварително напълнени с прясна хранителна среда.

Seeding density

1×10^4 клетки/cm²

Fluid renewal

2 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 HaCaT-ras A5 | 300494**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**

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 HaCaT-ras A5 | 300494**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.

HLA алели

A*: '31:01:02
B*: '40:01:02, '51:01:01
C*: '03:04:01, '15:02:01
DRB1*: '04:01:01, '15:01:01G
DQA1*: '01:02:01, '03:03:01
DQB1*: '03:01:01, '06:02:01
DPB1*: '03:01:01G, '04:01:01G
E: '01:03:01, '01:03:02