

Клетки Hep-70.4 | 400207

Обща информация

Description

Хепатомната клетъчна линия Hep-70.4 е получена от тумор на черния дроб на мишка, по-специално от щама C57BL/6J. Тази клетъчна линия се отличава с мутации в гена p53, които са идентифицирани на различни етапи по време на *in vitro* размножаването. При пасаж номер 8 е открит слаб допълнителен сигнал при анализа на полиморфизма с едноверижна конформация (SSCP), което показва наличието на мутация на p53. При пасаж номер 38 бяха идентифицирани две различни точкови мутации на p53: G:C към C:G трансверсия в кодон 135 и C:G към G:C трансверсия в кодон 138 на екзон 5. Тези мутации водят до промени в аминокиселините съответно от аланин към пролин и от цистеин към триптофан.

Клетъчната линия Hep-70.4 показва морфологичен фенотип, който се променя значително по време на размножаването ѝ. Някои подлинии проявяват епителна морфология, докато други показват фибробластен вид. Тази хетерогенност отразява сложния характер на клетъчната линия и нейната адаптивност при различни условия на култивиране. Наличието както на нормални, така и на мутирални алели на p53 в ранните пасажи предполага, че мутациите дават селективно предимство при растежа, което с течение на времето води до преобладаване на мутиралите клонове.

Анализът на протеините на междинните нишки на клетъчната линия Hep-70.4 разкрива експресия на прости кератини K8 и K18, които са типични за нормалните чернодробни клетки, както и на виментин и кератин K19 в различна степен. Тези протеинови модели потвърждават хепатоцитния произход на клетъчната линия и класифицирането ѝ като хепатомна линия. Геномната стабилност на Hep-70.4 е оценена допълнително чрез анализ на ДНК отпечатъци, който не разкрива никакви големи структурни аномалии, въпреки че се наблюдават промени в относителната интензивност на някои ленти с увеличаване на броя на пасажите.

Organism	Мишка
Tissue	Черен дроб
Disease	Хепатоцелуларен карцином
Synonyms	HEP-70.4, 70.4

Характеристики

Breed/Subspecies	C57BL/6J
Age	Възрастни
Gender	Жена
Morphology	Подобни на епител

Клетки Нер-70.4 | 400207

Growth properties Придържачи се

Регулаторни данни

Citation Нер-70.4 (каталожен номер на Cytion 400207)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 10090

CellosaurusAccession CVCL_5772

Биомолекуларни данни

Tumorigenic Да, при мишки С3Н/Не

Mutational profile Р53

Работа с

Culture Medium DMEM, w: 4,5 g/L глюкоза, w: 4 mM L-глутамин, w: 3,7 g/L NaHCO₃, w: 1,0 mM натриев пируват (номер на изделието на Cytion 820300a)

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 ресуспендирайте, 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.

Seeding density 1×10^4 клетки/cm²

Fluid renewal На всеки 3 до 5 дни

Клетки Нер-70.4 | 400207**Post-Thaw Recovery**

Оставете клетките да се възстановят за поне 24-48 часа.

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 $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 антимикробен 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

Клетки Нер-70.4 | 400207

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 / 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.