

## 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.

|                 |                          |
|-----------------|--------------------------|
| <b>Organism</b> | Мишка                    |
| <b>Tissue</b>   | Черен дроб               |
| <b>Disease</b>  | Хепатоцелуларен карцином |
| <b>Synonyms</b> | HEP-70.4, 70.4           |

## Характеристики

|                         |                   |
|-------------------------|-------------------|
| <b>Breed/Subspecies</b> | C57BL/6J          |
| <b>Age</b>              | Възрастни         |
| <b>Gender</b>           | Жена              |
| <b>Morphology</b>       | Подобни на епител |

## Клетки Нер-70.4 | 400207

**Growth properties** Придържаци се

## Регулаторни данни

**Citation** Нер-70.4 (каталожен номер на Cytion 400207)

**Biosafety level** 1

**NCBI\_TaxID** 10090

**CellosaurusAccession** CVCL\_5772

## Биомолекулярни 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 NaHCO<sub>3</sub>, 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**  $1 \times 10^4$  клетки/cm<sup>2</sup>

**Fluid renewal** На всеки 3 до 5 дни

**Клетки Hep-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  $-150^{\circ}\text{C}$ , 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  $37^{\circ}\text{C}$ , 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**

$37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , овлажнена атмосфера.

## Клетки Нер-70.4 | 400207

### Flask Coating

За оптимално прикрепване и жизнеспособност след размразяване препоръчваме да се използват **колби или плаки с колагеново покритие**.

### Freezing Procedure

Криоконсервираните клетъчни линии се транспортират върху сух лед във валидирана, изолирана опаковка с достатъчно хладилен агент, за да се поддържа приблизително  $-78^{\circ}\text{C}$  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  $-78^{\circ}\text{C}$  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  $-196^{\circ}\text{C}$ . Съхранението при  $-80^{\circ}\text{C}$  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.