

Buňky HCT116-Luc | 305787

Obecné informace

Description

HCT 116-Luc je derivát lidské buněčné linie kolorektálního karcinomu HCT 116, který exprimuje luciferázu. Tato linie byla vytvořena transdukcí konstruktem kódujícím luciferázu světlušky *Photinus pyralis* společně s kazetou rezistence na puromycin (*pac*), takže exprese reportéru je konstitutivní, nikoli závislá na signální dráze. Bioluminiscenční signál je proto úměrný počtu životaschopných buněk, díky čemuž je tento model vhodný pro neinvazivní sledování nádorové zátěže in vivo a pro rychlou kvantifikaci životaschopnosti a proliferace buněk in vitro pomocí kultivačních destiček.

Původní linie HCT 116 si v tomto derivátu zachovává své charakteristické rysy, včetně mikrosatelitové nestability s deficitem opravy neshod DNA, divokého typu TP53 a téměř diploidního karyotypu. Její mutační pozadí zahrnuje KRAS p.Gly13Asp, PIK3CA p.His1047Arg, heterozygotní mutaci CTNNB1 p.Ser45del, která stabilizuje β -katenin a řídí konstitutivní Wnt signální dráhu, a homozygotní frameshiftové mutace v genech TGFBR2 a ACVR2A, typické pro kolorektální nádory s MSI. Další varianty se vyskytují v genech CDKN2A, EP300, BRCA2 a PPM1D. Stabilní integrace reportéru umožňuje longitudinální zobrazování ortotopických a subkutánních xenotransplantátů u stejného zvířete, čímž se snižuje velikost kohort a odstraňuje nutnost terminálních koncových bodů v každém časovém bodě. K udržení transgenu během rutinní expanze se používá selekce puromycinem.

Tato linie je široce využívána v preklinické onkologii, ve studiích účinnosti cytotoxických a cílených látek, v modelech metastázování a navádění nádorů a ve vysoce výkonném screeningu cytotoxicity, kde luminiscenční měření nabízí širší dynamický rozsah než kolorimetrické testy. Vzhledem k tomu, že exprese luciferázy není pod indukovatelnou kontrolou, signál informuje spíše o počtu buněk a metabolickém stavu než o aktivitě konkrétní signální dráhy, takže sloučeniny, které mění hladiny ATP nebo buněčný metabolismus, mohou ovlivnit luminiscenci nezávisle na usmrcování buněk. K potvrzení se doporučují ortogonální testy životaschopnosti a při interpretaci reakcí na látky poškozující DNA a imunomodulační léčby je třeba zohlednit defekt oprav nesouladu v pozadí linie HCT 116.

Organism

Člověk

Tissue

Střeva

Disease

Karcinom tlustého střeva

Charakteristika

Age

48 let

Gender

Muži

Ethnicity

Kavkazský

Morphology

Epitelu podobné

Buňky HCT116-Luc | 305787

Growth properties

Adherentní

Regulační údaje

Citation

HCT116-Luc (katalogové číslo Cytion 305787)

Biosafety level

1

NCBI_TaxID

9606

CellosaurusAccession

CVCL_C8WT

GMO Status

GMO-S1: Tato buněčná linie obsahuje stabilně integrovanou reportérovou kazetu s luciferázou světlušky (Luc2, s optimalizovanými kodony), která byla zavedena pomocí lentivirové transdukce s neschopností replikace. Výsledná polyklonální buněčná populace byla udržována pod selekcí puromycinem (1–5 µg/ml). Je vyžadována bezpečnostní třída S1. Tato klasifikace platí pouze v Německu a v jiných zemích se může lišit.

Biomolekulární data

Antigen expression

Luc2 (světluška, s optimalizovanými kodony)

Mutational profile

Mutace: p.Lys437Argfs*5, homozygotní; Mutace: p.Ile2675Aspfs*6, heterozygotní; Mutace: p.Arg24Serfs*20, heterozygotní; Mutace: p.Ser45del, heterozygotní; Mutace: p.Met1470Cysfs*22, heterozygotní; Mutace: p.Asn1700Thrfs*9, heterozygotní; Mutace: p.Gly13Asp, heterozygotní; Mutace: p.His1047Arg, heterozygotní; Mutace: p.Leu450Ter, heterozygotní; Mutace: p.Lys128Serfs*35, homozygotní

Zpracování

Culture Medium

McCoy's 5a, w: 3,0 g/l glukóza, w: stabilní glutamin, w: 2,0 mM pyruvát sodný, w: 2,2 g/l NaHCO₃ (číslo článku Cytion 820200a)

Supplements

Doplňte médium o 10% FBS

Dissociation Reagent

Accutase

Seeding density

 $1-3 \times 10^4/\text{cm}^2$

Buňky HCT116-Luc | 305787**Freeze medium**

Jako kryokonzervační médium používáme kompletní růstové médium (včetně FBS) + 10 % DMSO pro zajištění dostatečné životaschopnosti po rozmrazení nebo CM-1 (katalogové číslo 800100 společnosti Cytion), které obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory pro zlepšení regenerace a snížení stresu způsobeného kryo.

Thawing and Culturing Cells

1. Ověřte si, že lahvička zůstane při dodání hluboce zmrazená, protože buňky se přepravují na suchém ledu, aby se během přepravy udržely optimální teploty.
2. Po obdržení kryovialku buď okamžitě uložte při teplotě nižší než -150 °C, abyste zajistili zachování buněčné integrity, nebo přejděte ke kroku 3, pokud je nutná okamžitá kultivace.
3. Pro okamžitou kultivaci rychle rozmrazte lahvičku ponořením do vodní lázně o teplotě 37 °C s čistou vodou a antimikrobiálním prostředkem a jemně ji míchejte po dobu 40-60 sekund, dokud nezůstane malý ledový chuchvalec.
4. Všechny další kroky provádějte za sterilních podmínek v průtokové digestoři a před otevřením kryovialku dezinfikujte 70% ethanolem.
5. Opatrně otevřete dezinfikovanou lahvičku a přeneste buněčnou suspenzi do 15 ml centrifugační zkumavky obsahující 8 ml kultivačního média o pokojové teplotě a jemně promíchejte.
6. Směs odstředíte při 300 x g po dobu 3 minut, aby se buňky oddělily, a supernatant obsahující zbytky mrazicího média opatrně zlikvidujete.
7. Pelety buněk jemně resuspendujte v 10 ml čerstvého kultivačního média. U adherentních buněk rozdělíte suspenzi mezi dvě kultivační baňky T25; u suspenzních kultur přeneste veškeré médium do jedné baňky T25, abyste podpořili účinnou interakci a růst buněk.
8. Dodržujte zavedené subkultivační protokoly pro kontinuální růst a udržování buněčné linie, čímž zajistíte spolehlivé výsledky experimentů.

Incubation Atmosphere

37 °C, 5 % CO_2 , zvlhčená atmosféra.

Shipping Conditions

Kryokonzervované buněčné linie se přepravují na suchém ledu v ověřených, izolovaných obalech s dostatečným množstvím chladiva, aby se po celou dobu přepravy udržovala teplota přibližně -78 °C. Po obdržení ihned zkontrolujte obal a neprodleně přeneste lahvičky do vhodného skladu.

Buňky HCT116-Luc | 305787

Storage Conditions

Pro dlouhodobé uchování umístěte lahvičky do kapalného dusíku v plynné fázi při teplotě přibližně -150 až -196 °C. Skladování při -80 °C je přijatelné pouze jako krátký přechodný krok před přemístěním do kapalného dusíku.

Kontrola kvality a molekulární analýza

Sterility

Kontaminace mykoplazmaty je vyloučena jak pomocí testů založených na PCR, tak pomocí luminiscenčních metod detekce mykoplazmy.

Aby se zajistilo, že nedojde ke kontaminaci bakteriemi, plísněmi nebo kvasinkami, jsou buněčné kultury denně podrobovány vizuální kontrolám.