

Buňky NCI-H1299-RFP | 300272

Obecné informace

Description

Buňky NCI-H1299 RFP, modifikované tak, aby obsahovaly reportér v genu DAPK1, jsou užitečné nejen pro studium aktivace specifických genů, ale také umožňují širší pochopení toho, jak buňky reagují na epigenetické léky globálně. Pomocí techniky zvané Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) byli vědci schopni podrobně popsat změny v místech, kde začíná transkripce napříč genomem v reakci na léčbu DNMTi (DAC), HDACi (SAHA nebo SB939) nebo jejich kombinací. Tato metoda odhaluje nejen očekávanou reaktivaci genu DAPK1, ale také vznik nových míst začátku transkripce, tzv. neanotovaných TSS (TINAT), zejména při léčbě léky. Tato nová startovací místa se obvykle nacházejí v oblastech genomu, kde se obvykle nevytvářejí proteiny, a vedou ke vzniku nových molekul RNA, které by potenciálně mohly kódovat proteiny.

Další analýzy ukazují, že tyto nové molekuly RNA se někdy mohou spojit se stávajícími a vytvořit tak tzv. fúzní transkripty TINAT-exonů. V závislosti na tom, jak jsou tyto transkripty spojeny, se mohou proměnit v nové, netypické proteiny. Tento proces byl potvrzen laboratorními technikami, které prokázaly, že tyto transkripty mohou skutečně vést k produkci nových forem bílkovin. Tyto bílkoviny mohou v buňce abnormálně interagovat nebo mohou být imunitním systémem rozpoznány jako cizí, což může nabídnout nové cíle pro léčbu rakoviny.

Aktivace těchto TINAT zahrnuje složité změny v metylaci DNA i v modifikacích histonů, což ilustruje komplexní interakci mezi těmito epigenetickými faktory při léčbě léky. Zejména kombinované použití DAC a SB939 vykazuje větší účinek a zvyšuje expresi těchto nových transkriptů více, než když je použito jedno z těchto léčiv samostatně. Pochopení těchto interakcí a jejich výsledků pomáhá objasnit, jak epigenetické terapie mění chování buněk, a otevírá možnosti pro nové způsoby léčby rakoviny, které tyto komplexní molekulární změny využívají.

Organism Člověk

Tissue Plíce

Disease Velkobuněčný karcinom

Charakteristika

Morphology Epitelu podobné

Growth properties Adherentní

Regulační údaje

Citation NCI-H1299-EGFP, s rezistencí na G418 a potlačeným reportérem (DKFZ č. P-1045) (katalogové číslo Cytion 300272)

Biosafety level 1

Buňky NCI-H1299-RFP | 300272

NCBI_TaxID 9606

CellosaurusAccession CVCL_xB25

Biomolekulární data

Zpracování

Culture Medium RPMI 1640, w: 2,0 mM stabilní glutamin, w: 2,0 g/l NaHCO₃ (číslo výrobku Cytion 820700a)**Supplements** Doplňte médium o 10% FBS**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Odstraňte staré médium z adherovaných buněk a promyjte je PBS bez vápníku a hořčíku. Pro baňky T25 použijte 3-5 ml PBS a pro baňky T75 5-10 ml. Poté buňky zcela zakryjte přípravkem Accutase, přičemž použijte 1-2 ml pro baňky T25 a 2,5 ml pro baňky T75. Nechte buňky inkubovat při pokojové teplotě po dobu 8-10 minut, aby se oddělily. Po inkubaci jemně promíchejte buňky s 10 ml média, aby byly znovu suspendovány, a poté je odstředte při 300xg po dobu 3 minut. Supernatant vyhodte, buňky znovu rozpusťte v čerstvém médiu a přeneste je do nových baněk, které již obsahují čerstvé médium.**Split ratio** Doporučuje se poměr 1:3 až 1:4**Fluid renewal** 2 až 3krát týdně**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.

Buňky NCI-H1299-RFP | 300272

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 odstředujte při 300 x g po dobu 3 minut, aby se buňky oddělily, a supernatant obsahující zbytky mrazicího média opatrně zlikvidujte.
7. Pelety buněk jemně resuspendujte v 10 ml čerstvého kultivačního média. U adherentních buněk rozdělte 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.

Flask Coating

Pro optimální uchycení a životaschopnost po rozmrazení doporučujeme používat **baňky nebo destičky potažené kolagenem**.

Freezing Procedure

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 NCI-H1299-RFP | 300272

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.

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 / Genetický profil / HLA

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 vizuálním kontrolám.

Profil STR

Amelogenin: x,y
PEZ6: LCLC-97TM1