

## Buňky Hep-56.1B | 400202

## Obecné informace

## Description

Hepatomová buněčná linie Hep-70.4 je odvozena z myšního jaterního nádoru, konkrétně z myšního kmene C57BL/6J. Tato buněčná linie je pozoruhodná svými mutacemi v genu p53, které byly identifikovány v různých fázích během in vitro množení. Při pasáži číslo 8 byl při analýze jednořetězcového konformačního polymorfismu (SSCP) zjištěn slabý dodatečný signál, který naznačuje přítomnost mutace p53. V pasáži číslo 38 byly identifikovány dvě odlišné bodové mutace p53: transverze G:C na C:G v kodonu 135 a transverze C:G na G:C v kodonu 138 exonu 5. Na základě těchto mutací bylo zjištěno, že se v p53 vyskytují dvě různé bodové mutace. Tyto mutace vedly ke změnám aminokyselin z alaninu na prolin a cysteinu na tryptofan.

Buněčná linie Hep-70.4 vykazuje morfologický fenotyp, který se během jejího množení výrazně mění. Některé sublinie vykazují epiteliální morfologii, zatímco jiné vykazují vzhled podobný fibroblastům. Tato heterogenita odráží komplexní povahu buněčné linie a její adaptabilitu za různých kultivačních podmínek. Přítomnost normálních i mutovaných alel p53 v raných pasážích naznačuje, že mutace poskytují selektivní růstovou výhodu, což vede k tomu, že postupem času převažují mutované klony.

Analýza proteinů intermediárních vláken buněčné linie Hep-70.4 odhalila expresi jednoduchých keratinů K8 a K18, které jsou typické pro normální jaterní buňky, a také vimentinu a keratinu K19 v různé míře. Tyto proteinové vzorce potvrzují hepatocytární původ buněčné linie a její zařazení mezi hepatomové linie. Genomická stabilita Hep-70.4 byla dále hodnocena pomocí analýzy otisků DNA, která neodhalila žádné závažné strukturální abnormality, ačkoli s rostoucím počtem pasáží byly pozorovány změny v relativní intenzitě některých pásů.

<b>Organism</b>	Myš
<b>Tissue</b>	Játra
<b>Disease</b>	Hepatocelulární karcinom
<b>Synonyms</b>	HEP-56.1B, 56.1B, 56.1b

## Charakteristika

<b>Breed/Subspecies</b>	C57BL/6J
<b>Age</b>	Dospělí
<b>Gender</b>	Ženy
<b>Morphology</b>	Epitelu podobné
<b>Growth properties</b>	Adherentní

## Buňky Hep-56.1B | 400202

## Regulační údaje

<b>Citation</b>	Hep-56.1B (katalogové číslo Cytion 400202)
<b>Biosafety level</b>	1
<b>NCBI_TaxID</b>	10090
<b>CellosaurusAccession</b>	CVCL_5767

## Biomolekulární data

<b>Protein expression</b>	Keratin 8, keratin 18, vimentin.
<b>Tumorigenic</b>	Ano, u myší C57BL/6J
<b>Mutational profile</b>	P53mut (kodon 277 v exonu 8 => Arginin -- Threonin).

## Zpracování

<b>Culture Medium</b>	DMEM, w: 4,5 g/l glukózy, w: 4 mM L-glutaminu, w: 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> , w: 1,0 mM pyruvátu sodného (číslo výrobku Cytion 820300a)
<b>Supplements</b>	Doplňte médium o 10% FBS
<b>Dissociation Reagent</b>	Accutase
<b>Subculturing</b>	Odstraňte staré médium z adherovaných buněk a promyjte je PBS bez vápníku a hořčičku. 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 rozpustte v čerstvém médiu a přeneste je do nových baněk, které již obsahují čerstvé médium.
<b>Split ratio</b>	Doporučuje se poměr 1:4 až 1:8
<b>Seeding density</b>	1 x 10 <sup>4</sup> buněk/cm <sup>2</sup>

## Buňky Hep-56.1B | 400202

**Fluid renewal** Každých 3 až 5 dní

**Post-Thaw Recovery** Po rozmrazení naneste buňky v množství  $5 \times 10^4$  buněk/cm<sup>2</sup> a nechte je alespoň 24 hodin zotavit se z procesu zmrazení a přilnout.

**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 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<sub>2</sub>, zvlhčená atmosféra.

**Buňky Hep-56.1B | 400202****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.

**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**

**M\_18-3:** 16  
**M\_4-2:** 20.3  
**M\_6-7:** 17  
**M\_3-2:** 14  
**M\_19-2:** 13  
**M\_7-1:** 26.2  
**M\_1-1:** 16  
**M\_8-1:** 16  
**M\_2-1:** 15  
**M\_15-3:** 22.3  
**M\_6-4:** 18  
**M\_11-2:** 16  
**M\_1-2:** 19  
**M\_17-2:** 15  
**M\_12-1:** 17  
**M\_5-5:** 17  
**M\_X-1:** 28  
**M\_13-1:** 17  
**Human D4/D8:** -