

NCI-H1299-RFP-celler | 300272

Generel information

Description

NCI-H1299 RFP-cellerne, der er modificeret til at indeholde en reporter i DAPK1-genet, er ikke kun nyttige til at studere specifik genaktivering, men giver også en bredere forståelse af, hvordan celler reagerer på epigenetiske lægemidler globalt. Ved at bruge en teknik kaldet Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) har forskerne været i stand til at beskrive ændringer i, hvor transkriptionen starter på tværs af genomet som reaktion på behandlinger med DNMTi (DAC), HDACi (SAHA eller SB939) eller kombinationer af disse. Denne metode afslører ikke kun den forventede reaktivering af DAPK1-genet, men også fremkomsten af nye transkriptionsstartsteder, kaldet behandlingsinducerede ikke-annoterede TSS'er (TINAT'er), især under lægemiddelbehandling. Disse nye startsteder er typisk placeret i områder af genomet, der normalt ikke producerer proteiner, og fører til dannelsen af nye RNA-molekyler, der potentielt kan kode for proteiner.

Yderligere analyser viser, at disse nye RNA-molekyler nogle gange kan smelte sammen med eksisterende RNA-molekyler og danne såkaldte TINAT-exon-fusionstranskripter. Afhængigt af, hvordan disse transkripter splejses, kan de oversættes til nye, atypiske proteiner. Denne proces er blevet bekræftet gennem laboratorietechnikker, der viser, at disse transkripter faktisk kan føre til produktion af nye proteinformer. Disse proteiner kan interagere unormalt i cellen eller blive genkendt som fremmede af immunsystemet, hvilket potentielt kan give nye mål for kræftbehandling.

Aktiveringen af disse TINATs involverer udviklede ændringer i både DNA-methylering og histonmodifikationer, hvilket illustrerer et komplekst samspil mellem disse epigenetiske faktorer under lægemiddelbehandling. Især den kombinerede brug af DAC og SB939 viser en større effekt og øger udtrykket af disse nye transkripter mere, end når et af lægemidlerne bruges alene. Forståelsen af disse interaktioner og deres resultater hjælper med at afklare, hvordan epigenetiske terapier ændrer cellernes adfærd, og åbner muligheder for nye kræftbehandlinger, der udnytter disse komplekse molekylære ændringer.

Organism Menneske

Tissue Lunge

Disease Storcellet karcinom

Metastatic site Primær tumorlokalisering (lunge)

Applications Forskning i epigenetisk terapi; reaktivering af DAPK1-genet; undersøgelser af respons på DNMTi- og HDACi-lægemidler; behandlingsinducerede, ikke-annoterede transkriptionsstartsteder (TINAT'er); CAGE-transkriptomik; analyse af fusionstranskripter; atypisk proteinproduktion fra kryptiske promotorer; screening af epigenetiske lægemiddelkombinationer

Karakteristika

Morphology Epitel-lignende

Cell type Epitheliale celler

NCI-H1299-RFP-celler | 300272

Growth properties

Vedhæftende

Regulatoriske data

Citation

NCI-H1299-EGFP, med G418-resistens og inaktiveret reporter (DKFZ # P-1045) (Cytion-katalognummer 300272)

Biosafety level

1

NCBI_TaxID

9606

CellosaurusAccession

CVCL_XB25

GMO Status

GMO-S1: Dette NCI-H1299-derivat (DKFZ #P-1045) indeholder en stabilt inaktiveret EGFP-reporter i DAPK1-lokuset, hvilket muliggør måling af epigenetisk reaktivering. G418-resistenskassette til stede. Denne klassificering gælder kun i Tyskland og kan være anderledes andre steder.

Biomolekylære data

Håndtering

Culture Medium

RPMI 1640, m: 2,0 mM stabil glutamin, m: 2,0 g/L NaHCO₃ (Cytion artikelnummer 820700a)

Supplements

Suppler mediet med 10% FBS

Dissociation Reagent

Accutase

Doubling time

ca. 24 til 36 timer

Subculturing

Fjern det gamle medium fra de klæbende celler, og vask dem med PBS, der ikke indeholder calcium og magnesium. Brug 3-5 ml PBS til T25-kolber og 5-10 ml til T75-kolber. Dæk derefter cellerne helt med Accutase, brug 1-2 ml til T25-kolber og 2,5 ml til T75-kolber. Lad cellerne inkubere ved stuetemperatur i 8-10 minutter for at løsne dem. Efter inkubationen blandes cellerne forsigtigt med 10 ml medium for at resuspendere dem, og centrifugeres derefter ved 300xg i 3 minutter. Kassér supernatanten, resuspender cellerne i frisk medium, og overfør dem til nye kolber, der allerede indeholder frisk medium.

Split ratio

1 til 5

NCI-H1299-RFP-celler | 300272

Seeding density 1 til 3×10^4 celler/cm²

Fluid renewal 2 til 3 gange om ugen

Freeze medium Som kryopræservationsmedium bruger vi komplet vækstmedium (inklusive FBS) + 10 % DMSO for tilstrækkelig levedygtighed efter optøning eller CM-1 (Cytion-katalognummer 800100), som indeholder optimerede osmobeskyttende stoffer og metaboliske stabilisatorer for at forbedre genopretningen og reducere kryo-induceret stress.

Thawing and Culturing Cells

1. Bekræft, at hætteglasset forbliver dybfrosset ved levering, da cellerne sendes på tøris for at opretholde optimale temperaturer under transport.
2. Ved modtagelsen skal du enten straks opbevare kryohætteglasset ved temperaturer under -150 °C for at sikre, at cellernes integritet bevares, eller gå videre til trin 3, hvis øjeblikkelig dyrkning er påkrævet.
3. Ved øjeblikkelig dyrkning optøs hætteglasset hurtigt ved at nedsænke det i et 37 °C varmt vandbad med rent vand og et antimikrobielt middel og røre forsigtigt i 40-60 sekunder, indtil der kun er en lille isklump tilbage.
4. Udfør alle efterfølgende trin under sterile forhold i en flowhætte, og desinficer kryovialet med 70 % ethanol, før det åbnes.
5. Åbn forsigtigt det desinficerede hætteglas, og overfør cellesuspensionen til et 15 ml centrifugerør, der indeholder 8 ml kulturmedium ved stuetemperatur, og bland forsigtigt.
6. Centrifuger blandingen ved 300 x g i 3 minutter for at adskille cellerne, og kassér omhyggeligt supernatanten, der indeholder resterende frysemedium.
7. Resuspender forsigtigt cellepelleten i 10 ml frisk dyrkningsmedium. For klæbende celler deles suspensionen mellem to T25-kulturkolber; for suspensionskulturer overføres alt mediet til en T25-kolbe for at fremme effektiv celleinteraktion og -vækst.
8. Overhold etablerede subkulturprotokoller for fortsat vækst og vedligeholdelse af cellelinjen, hvilket sikrer pålidelige eksperimentelle resultater.

Incubation Atmosphere 37°C, 5%_{CO2}, befugtet atmosfære.

Flask Coating Ingen

NCI-H1299-RFP-celler | 300272

Freezing Procedure

Kryopræservede cellelinjer sendes på tøris i valideret, isoleret emballage med tilstrækkeligt kølemiddel til at opretholde ca. -78 °C under hele transporten. Ved modtagelse skal beholderen straks inspiceres, og hætteglassene skal straks overføres til passende opbevaring.

Shipping Conditions

Kryopræservede cellelinjer sendes på tøris i valideret, isoleret emballage med tilstrækkeligt kølemiddel til at opretholde ca. -78 °C under hele transporten. Ved modtagelse skal beholderen straks inspiceres, og hætteglassene skal straks overføres til passende opbevaring.

Storage Conditions

For langtidsopbevaring anbringes hætteglas i flydende nitrogen i dampfase ved ca. -150 til -196 °C. Opbevaring ved -80 °C er kun acceptabelt som et kort mellemtrin før overførsel til flydende nitrogen.

Kvalitetskontrol og molekylær analyse

Sterility

Mycoplasma-kontaminering udelukkes ved hjælp af både PCR-baserede assays og luminescensbaserede mycoplasma-detektionsmetoder.

For at sikre, at der ikke er nogen bakterie-, svampe- eller gærforurening, underkastes cellekulturerne daglige visuelle inspektioner.