Product sheet

Κύτταρα NCI-H1299-RFP | 300272

Γενικές πληροφορίες

Description	Τα κύτταρα NCI-H1299 RFP, τροποποιημένα ώστε να περιλαμβάνουν έναν αναμεταδότη στο γονίδιο DAPK1, δεν είναι μόνο χρήσιμα για τη μελέτη της ενεργοποίησης συγκεκριμένων γονιδίων, αλλά παρέχουν επίσης μια ευρύτερη κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τα κύτταρα αντιδρούν στα επιγενετικά φάρμακα σε παγκόσμιο επίπεδο. Με τη χρήση μιας τεχνικής που ονομάζεται Cap Analysis of Gene Expression (CAGE), οι ερευνητές μπόρεσαν να καταγράψουν λεπτομερώς τις αλλαγές στο σημείο όπου ξεκινά η μεταγραφή σε όλο το γονιδίωμα σε απόκριση σε θεραπείες με DNMTi (DAC), HDACi (SAHA ή SB939) ή συνδυασμούς τους. Η μέθοδος αυτή αποκαλύπτει όχι μόνο την αναμενόμενη επανενεργοποίηση του γονιδίου DAPK1, αλλά και την εμφάνιση νέων θέσεων έναρξης της μεταγραφής, που ονομάζονται επαγόμενες από τη θεραπεία μη σημειωμένες TSS (TINAT), ιδίως υπό φαρμακευτική αγωγή. Αυτές οι νέες θέσεις εκκίνησης βρίσκονται συνήθως σε περιοχές του γονιδιώματος που συνήθως δεν παράγουν πρωτεΐνες και οδηγούν στη δημιουργία νέων μορίων RNA που θα μπορούσαν δυνητικά να κωδικοποιήσουν πρωτεΐνες. Περαιτέρω ανάλυση δείχνει ότι αυτά τα νέα μόρια RNA μπορούν μερικές φορές να συγχωνευθούν με τα υπάρχοντα και να σχηματίσουν τα λεγόμενα μεταγραφήματα σύντηξης TINAT-εξονίων. Ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο αυτά τα μεταγράμματα ενώνονται, μπορούν να μεταφραστούν σε νέες, άτυπες πρωτεΐνες. Η διαδικασία αυτή έχει επιβεβαιωθεί μέσω εργαστηριακών τεχνικών που αποδεικνύουν ότι αυτά τα μεταγράμματα μπορούν πράγματι να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων μορφών πρωτεϊνών. Αυτές οι πρωτεΐνες μπορεί να αλληλεπιδρούν ανώμαλα μέσα στο κύτταρο ή να αναγνωρίζονται ως ξένες από το ανοσοποιητικό σύστημα, προσφέροντας ενδεχομένως νέους στόχους για τη θεραπεία του καρκίνου. Η ενεργοποίηση αυτών των TINATs περιλαμβάνει περίπλοκες αλλαγές τόσο στη μεθυλίωση του DNA όσο και στις τροποποιήσεις των ιστονών, καταδεικνύοντας μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των επιγενετικών παραγόντων υπό φαρμακευτική αγωγή. Ειδικότερα, η συνδυασμένη χρήση των DAC και SB939 παρουσιάζει μεγαλύτερη επίδραση, ενισχύοντας την έκφραση αυτών των νέων μεταγραφών περισσότερο από ό,τι όταν χρησιμοποιείται μόνο του ένα από τα δύο φάρμακα. Η κατανόηση αυτών των αλληλεπιδράσεων και των αποτελεσμάτων τους συμβάλλει στην αποσαφήνιση του τρόπου με τον οποίο οι επιγενετικές θεραπείες μεταβάλλουν τη συμπεριφορά των κυττάρων και ανοίγει δυνατότητες για νέες θεραπείες του καρκίνου που αξιοποιούν αυτές τις πολύπλοκες μοριακές αλλαγές.
Organism	Ανθρώπινο
Tissue	Πνεύμονας
Disease	Καρκίνωμα μεγάλων κυττάρων
Metastatic site	Θέση πρωτογενούς όγκου (πνεύμονας)
Applications	Έρευνα στην επιγενετική θεραπεία· επανενεργοποίηση του γονιδίου DAPK1· μελέτες ανταπόκρισης σε φάρμακα DNMTi και HDACi· μη καταχωρημένα σημεία έναρξης μεταγραφής (TINAT) που προκαλούνται από τη θεραπεία· μεταγραφωμική ανάλυση CAGE· ανάλυση μεταγραφών σύντηξης· παραγωγή άτυπων πρωτεϊνών από κρυφούς προαγωγείς· διαλογή συνδυασμών επιγενετικών φαρμάκων

Χαρακτηριστικά

Κύτταρα NCI-H1299-RFP | 300272

Morphology	Επιθηλιοειδής
Cell type	Επιθηλιακά κύτταρα
Growth properties	Προσκολλημένο

Ρυθμιστικά δεδομένα

Citation	NCI-H1299-EGFP, με αντοχή στο G418 και σιωπηρό δείκτη (DKFZ # P-1045) (αριθμός καταλόγου Cytion 300272)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_XB25
GMO Status	GMO-S1: Αυτό το παράγωγο της σειράς NCI-H1299 (DKFZ #P-1045) περιέχει έναν δείκτη EGFP που έχει υποστεί σταθερή σίγηση στο γονιδιακό τόπο DAPK1, επιτρέποντας την ανίχνευση της επιγενετικής επανενεργοποίησης. Περιλαμβάνεται κασέτα αντοχής στο G418. Η παρούσα ταξινόμηση ισχύει μόνο στη Γερμανία και ενδέχεται να διαφέρει σε άλλες χώρες.

Βιομοριακά δεδομένα

Χειρισμός

Culture Medium	RPMI 1640, w: 2,0 mM σταθερής γλουταμίνης, w: 2,0 g/L NaHCO3 (αριθμός άρθρου Cytion 820700a)
Supplements	Συμπληρώστε το μέσο με 10% FBS
Dissociation Reagent	Accutase
Doubling time	περίπου 24 έως 36 ώρες

Κύτταρα NCI-H1299-RFP | 300272

Subculturing	Αφαιρέστε το παλιό μέσο από τα προσκολλημένα κύτταρα και πλύντε τα με PBS που δεν περιέχει ασβέστιο και μαγνήσιο. Για φιάλες T25, χρησιμοποιήστε 3-5 ml PBS και για φιάλες T75, χρησιμοποιήστε 5-10 ml. Στη συνέχεια, καλύψτε πλήρως τα κύτταρα με Accutase, χρησιμοποιώντας 1-2 ml για φιάλες T25 και 2,5 ml για φιάλες T75. Αφήστε τα κύτταρα να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου για 8-10 λεπτά για να αποκολληθούν. Μετά την επώαση, αναμείξτε απαλά τα κύτταρα με 10 ml μέσου για να ανασυσταθούν και, στη συνέχεια, φυγοκεντρίστε στα 300xg για 3 λεπτά. Απορρίψτε το υπερκείμενο υγρό, ανασυστάστε τα κύτταρα σε φρέσκο μέσο και μεταφέρετέ τα σε νέες φιάλες που περιέχουν ήδη φρέσκο μέσο.
Split ratio	1 έως 5
Seeding density	1 έως 3 × 10^4 κύτταρα/cm^2
Fluid renewal	2 έως 3 φορές την εβδομάδα
Freeze medium	Ως μέσο κρυοσυντήρησης, χρησιμοποιούμε πλήρες μέσο ανάπτυξης (συμπεριλαμβανομένου του FBS) + 10% DMSO για επαρκή βιωσιμότητα μετά την απόψυξη, ή CM-1 (αριθμός καταλόγου Cytion 800100), το οποίο περιλαμβάνει βελτιστοποιημένα ωσμοπροστατευτικά και μεταβολικούς σταθεροποιητές για την ενίσχυση της ανάκαμψης και τη μείωση του στρες που προκαλείται από την κρυοσυντήρηση.

Κύτταρα NCI-H1299-RFP | 300272

Thawing and Culturing Cells

1. Επιβεβαιώστε ότι το φιαλίδιο παραμένει βαθιά παγωμένο κατά την παράδοση, καθώς τα κύτταρα αποστέλλονται σε ξηρό πάγο για να διατηρούνται οι βέλτιστες θερμοκρασίες κατά τη μεταφορά.

2. Κατά την παραλαβή, είτε αποθηκεύστε το κρυοφιαλίδιο αμέσως σε θερμοκρασίες κάτω των -150°C για να διασφαλίσετε τη διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας, είτε προχωρήστε στο βήμα 3 εάν απαιτείται άμεση καλλιέργεια.

3. Για άμεση καλλιέργεια, αποψύξτε γρήγορα το φιαλίδιο βυθίζοντάς το σε υδατόλουτρο 37°C με καθαρό νερό και αντιμικροβιακό παράγοντα, αναδεύοντας απαλά για 40-60 δευτερόλεπτα μέχρι να παραμείνει ένα μικρό σβόλο πάγου.

4. Εκτελέστε όλα τα επόμενα βήματα υπό αποστειρωμένες συνθήκες σε απορροφητήρα ροής, απολυμαίνοντας το κρυοφιαλίδιο με 70% αιθανόλη πριν από το άνοιγμα.

5. Ανοίξτε προσεκτικά το απολυμασμένο φιαλίδιο και μεταφέρετε το εναιώρημα των κυττάρων σε ένα σωληνάριο φυγοκέντρησης των 15 ml που περιέχει 8 ml θρεπτικού μέσου καλλιέργειας σε θερμοκρασία δωματίου, αναμειγνύοντας απαλά.

6. Φυγοκεντρίστε το μείγμα στα 300 x g για 3 λεπτά για να διαχωριστούν τα κύτταρα και απορρίψτε προσεκτικά το υπερκείμενο που περιέχει το υπόλοιπο μέσο κατάψυξης.

7. Επανασυσσωματώστε απαλά το κυτταρικό σφαιρίδιο σε 10 ml φρέσκου μέσου καλλιέργειας. Για προσκολλημένα κύτταρα, μοιράστε το εναιώρημα σε δύο φιάλες καλλιέργειας T25- για καλλιέργειες εναιωρήματος, μεταφέρετε όλο το μέσο σε μία φιάλη T25 για να προωθήσετε την αποτελεσματική αλληλεπίδραση και ανάπτυξη των κυττάρων.

8. Τηρείτε τα καθιερωμένα πρωτόκολλα υποκαλλιέργειας για τη συνεχή ανάπτυξη και διατήρηση της κυτταρικής σειράς, εξασφαλίζοντας αξιόπιστα πειραματικά αποτελέσματα.

Incubation Atmosphere	37°C, 5%$_{CO2}$, υγροποιημένη ατμόσφαιρα.
Flask Coating	Κανένα
Freezing Procedure	Οι κρυοσυντηρημένες κυτταρικές σειρές αποστέλλονται σε ξηρό πάγο σε επικυρωμένη, μονωμένη συσκευασία με επαρκές ψυκτικό μέσο για τη διατήρηση περίπου των -78 °C καθ' όλη τη διάρκεια της μεταφοράς. Κατά την παραλαβή, επιθεωρήστε αμέσως τον περιέκτη και μεταφέρετε τα φιαλίδια χωρίς καθυστέρηση στην κατάλληλη αποθήκη.

Κύτταρα NCI-H1299-RFP | 300272

Shipping Conditions	Οι κρυοσυντηρημένες κυτταρικές σειρές αποστέλλονται σε ξηρό πάγο σε επικυρωμένη, μονωμένη συσκευασία με επαρκές ψυκτικό μέσο για τη διατήρηση περίπου των -78 °C καθ' όλη τη διάρκεια της μεταφοράς. Κατά την παραλαβή, επιθεωρήστε αμέσως τον περιέκτη και μεταφέρετε τα φιαλίδια χωρίς καθυστέρηση στην κατάλληλη αποθήκη.
Storage Conditions	Για μακροχρόνια συντήρηση, τοποθετήστε τα φιαλίδια σε υγρό άζωτο σε φάση ατμών σε θερμοκρασία περίπου -150 έως -196 °C. Η αποθήκευση στους -80 °C είναι αποδεκτή μόνο ως σύντομο ενδιάμεσο βήμα πριν από τη μεταφορά σε υγρό άζωτο.

Έλεγχος ποιότητας και μοριακή ανάλυση

Sterility	Η μόλυνση από μυκόπλασμα αποκλείεται με τη χρήση τόσο των δοκιμασιών που βασίζονται στην PCR όσο και των μεθόδων ανίχνευσης μυκοπλάσματος με βάση τη φωταύγεια. Για να διασφαλιστεί ότι δεν υπάρχει μόλυνση από βακτήρια, μύκητες ή ζύμες, οι κυτταροκαλλιέργειες υποβάλλονται σε καθημερινές οπτικές επιθεωρήσεις.