

MML-1 rakud | 300288**Üldine teave****Description**

MML-1 rakuliin on melanoomi rakuliin, mis on saadud pahaloomulisest melanoomist. Seda rakuliini kasutatakse peamiselt melanoomi bioloogia uurimiseks, eelkõige rakuvälise vesiklite (EV) rolli uurimiseks rakkudevahelises suhtluses ja kasvajate progresseerumises. MML-1 rakud vabastavad erinevaid EVde alatüüpe, sealhulgas eksosoomid, mikrovesiklid ja apoptootilised kehad, millest igaüks kannab erinevaid RNA-kooslusi, näiteks mikroRNAsid (miRNAd) ja muid mittekodeerivaid RNAsid.

Uuringud MML-1 rakkudega on näidanud, et nendest rakkudest vabanevad eksosoomid sisaldavad spetsiifilisi miRNAsid, nagu miR-214-3p, miR-199a-3p ja miR-155-5p, mis on tihedalt seotud melanoomi progresseerumise ja metastaasiga. Need miRNAd on eksosoomides võrreldes teiste EV-tüüpidega rikastatud ja neid on seostatud oluliste melanoomiga seotud radadega, nagu MAPK-signaalitee reguleerimine ja kasvaja mikrokeskkonna interaktsioonid. Huvitaval kombel näitavad MML-1-st saadud eksosoomide ja kliiniliste melanoomiproovide miRNA-profiilide võrdlused märkimisväärtset kattumist, mis näitab selle rakumudeli kliinilist tähtsust melanoomi progresseerumise mõistmisel.

Lisaks miRNadele vabastavad MML-1 rakud ka teisi mittekodeerivaid RNAsid, nagu väikesed nukleolaarsed RNAd (snoRNAd) ja mitokondriaalse ülekande RNAd (mt-RNAd), mis on EV alatüüpide vahel erinevalt jaotunud. Need leiud rõhutavad MML-1 rakuliini kasulikkust melanoomi molekulaarmehhanismide uurimisel, eelkõige seda, kuidas kasvajarakud suhtlevad EVde kaudu ja mõjutavad oma mikrokeskkonda.

Organism Inimene**Tissue** Nahk**Disease** Melanoom**Synonyms** MML1**Omadused****Age** Täpsustamata**Gender** Täpsustamata**Morphology** Epiteelilaadsed**Growth properties** Kinnipeetav**Regulatiivsed andmed****Citation** MML-1 (Cytioni katalooginumber 300288)

MML-1 rakud | 300288

Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_6004

Biomolekulaarsed andmed

Protein expression	P53 positiivne
Tumorigenic	Jah, alasti hiirtel
Reverse transcriptase	Negatiivne
Mutational profile	V600E tüüpi BRAF-mutatsioon määrati DNA-põhiste meetodite (sekveneerimine, RT-PCR) ja valgupõhiste meetodite (Western Blot) abil.

Töötlemine

Culture Medium	RPMI 1640, w: 2,0 mM stabiilne glutamiin, w: 2,0 g/L NaHCO ₃ (Cytioni artikli number 820700a)
Supplements	Täiendada söötme 10% FBS-ga
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Eemaldage kleepunud rakkudel vana söötme ja peske neid PBS-ga, milles puudub kaltsium ja magneesium. T25 kolbide puhul kasutage 3-5 ml PBS-i ja T75 kolbide puhul 5-10 ml. Seejärel katke rakud täielikult Accutase'iga, kasutades 1-2 ml T25 kolbide puhul ja 2,5 ml T75 kolbide puhul. Laske rakkudel inkubeerida 8-10 minutit toatemperatuuril, et need eralduksid. Pärast inkubeerimist segage rakud ettevaatlikult 10 ml söötmega, et neid resuspenseerida, seejärel tsentrifuugige 3 minutit 300xg juures. Visake supernatant ära, suspenseerige rakud uuesti värskes keskkonnas ja viige need uutesse kolvidesse, mis sisaldavad juba värsket keskkonda.
Seeding density	1×10^4 rakku/cm ²
Fluid renewal	2 kuni 3 korda nädalas
Post-Thaw Recovery	Pärast sulatamist asetage rakud plaadile tihedusega 5×10^4 rakku/cm ² ja laske rakkudel külmutamisprotsessist taastuda ja kinnituda vähemalt 24 tunni jooksul.

MML-1 rakud | 300288**Freeze medium**

Krüosäilitusvedelikusena kasutame täielikku kasvukeskkonda (sh FBS) + 10% DMSO, et tagada piisav elujõulisus pärast sulatamist, või CM-1 (Cytioni katalooginumber 800100), mis sisaldab optimeeritud osmoprotektante ja metaboolseid stabilisaatoreid, et parandada taastumist ja vähendada krüostressi.

Thawing and Culturing Cells

1. Veenduge, et viaal jääb tarnimisel sügavkülmutatud, sest rakud transporditakse kuiva jääga, et säilitada optimaalne temperatuur transpordi ajal.
2. Pärast kättesaamist säilitage krüoviaal kas kohe temperatuuril alla -150°C , et tagada rakkude tervikluse säilimine, või jätkake sammuga 3, kui on vaja koheselt kultiveerida.
3. Kohese kultiveerimise korral sulatage viaali kiiresti, kastes selle 37°C veevanni puhta vee ja antimikroobse ainega, segades seda õrnalt 40-60 sekundit, kuni alles jääb väike jääklomp.
4. Tehke kõik järgmised toimingud steriilsetes tingimustes vooluhoodis, desinfitseerides krüoviaal enne avamist 70% etanooliga.
5. Avage desinfitseeritud viaali ettevaatlikult ja viige rakususpensioon ettevaatlikult segades 15 ml tsentrifuugitorusse, mis sisaldab 8 ml toatemperatuuril olevat kasvukeskkonda.
6. Rakkude eraldamiseks tsentrifuugige segu $300 \times g$ juures 3 minutit ja visake ülejäänud külmutusvedelikku sisaldav supernatant ettevaatlikult ära.
7. Resuspendeerige rakupellet ettevaatlikult 10 ml värskes kasvukeskkonnas. Adhereerivate rakkude puhul jagage suspensioon kahe T25 kultuurkolvi vahel; suspensioonikultuuride puhul kandke kogu söötmeskkond ühte T25 kolbi, et soodustada rakkude tõhusat koostoimet ja kasvu.
8. Järgige kehtestatud subkultuuriprotokolle rakuliini jätkuvaks kasvuks ja säilitamiseks, tagades usaldusväärsed katsetulemused.

Incubation Atmosphere

37°C , 5% CO_2 , niisutatud atmosfäär.

Flask Coating

Puudub

Freezing Procedure

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu -78°C . Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige viaalid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

MML-1 rakud | 300288

Shipping Conditions

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu -78 °C. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige viaalid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

Storage Conditions

Pikaajaliseks säilitamiseks asetage viaalid aurufaasis vedela lämmastikuga umbes -150 kuni -196 °C juures. Säilitamine temperatuuril -80 °C on vastuvõetav ainult lühikese vaheetapina enne vedela lämmastikuga üleviimist.

Kvaliteedikontroll ja molekulaaranalüüs

Sterility

Mükoplasmakontaminatsioon on välistatud nii PCR-põhiste analüüside kui ka luminesentsil põhinevate mükoplasma tuvastamise meetodite abil.

Bakteriaalse, seene- või pärmsaaste puudumise tagamiseks kontrollitakse rakukultuure iga päev visuaalselt.