

NCI-H1299-RFP rakud | 300272

Üldine teave

Description

NCI-H1299 RFP rakud, mis on modifitseeritud, et lisada DAPK1 geeni reporter, ei ole kasulikud mitte ainult konkreetse geeni aktiveerimise uurimiseks, vaid annavad ka laiemat arusaama sellest, kuidas rakud reageerivad epigeneetilistele ravimitele globaalselt. Kasutades tehnikat nimega Cap Analysis of Gene Expression (CAGE), on teadlased suutnud üksikasjalikult kirjeldada muutusi selles, kus transkriptsioon algab kogu genoomis vastuseks ravile DNMTi (DAC), HDACi (SAHA või SB939) või nende kombinatsioonidega. See meetod näitab mitte ainult DAPK1 geeni oodatud reaktiveerimist, vaid ka uute transkriptsiooni alguskohtade, nn ravi poolt indutseeritud mitte-annoteeritud TSS-ide (TINAT) tekkimist, eriti ravimiravi korral. Need uued alguskohad asuvad tavaliselt genoomi piirkondades, mis tavaliselt ei tooda valke, ja põhjustavad uute RNA-molekulide tekkimist, mis võivad potentsiaalselt kodeerida valke.

Edasine analüüs näitab, et need uued RNA-molekulid võivad mõnikord ühineda olemasolevate molekulidega, moodustades nn TINAT-eksoonide fusioonitranskripte. Sõltuvalt sellest, kuidas need transkriptid splaissitakse, võivad need tõlkida uuteks ebatüüpilisteks valkudeks. Seda protsessi on kinnitatud laboratoorsete meetoditega, mis näitavad, et need transkriptid võivad tõepoolest viia uute valguvormide tekkimiseni. Need valgud võivad rakus ebatavaliselt suhelda või immuunsüsteem võib neid võõrkehadena ära tunda, mis võib pakkuda uusi sihtmärke vähiravi jaoks.

Nende TINATide aktiveerimine hõlmab keerulisi muutusi nii DNA metüleerimises kui ka histoonide modifikatsioonides, mis näitab nende epigeneetiliste tegurite keerulist koostoimet ravimiravi korral. Eriti suur mõju on DAC ja SB939 kombineeritud kasutamisel, mis suurendab nende uudsete transkriptide ekspressiooni rohkem kui kummagi ravimi eraldi kasutamisel. Nende koostoimete ja nende tulemuste mõistmine aitab selgitada, kuidas epigeneetilised ravimeetodid muudavad rakkude käitumist, ning avab võimalusi uute vähiravi meetodite jaoks, mis kasutavad ära neid keerulisi molekulaarseid muutusi.

Organism Inimene

Tissue Kopsud

Disease Suurrakuline kartsinoom

Omadused

Morphology Epiteelilaadsed

Growth properties Kinnipeetav

Regulatiivsed andmed

Citation NCI-H1299-EGFP, G418-resistentsusega ja vaigistatud reportergeeniga (DKFZ nr P-1045) (Cytion katalooginumber 300272)

NCI-H1299-RFP rakud | 300272

Biosafety level 1**NCBI_TaxID** 9606**Biomolekulaarsed andmed****Töötlemine****Culture Medium** RPMI 1640, w: 2,0 mM stabiilne glutamiin, w: 2,0 g/L NaHCO₃ (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.**Fluid renewal** 2 kuni 3 korda nädalas**Freeze medium** Krüosäilitusvedelikusena kasutame täielikku kasvukeskkonda (sh FBS) + 10% DMSO, et tagada piisav elujõulisus pärast sulatamist, või CM-1 (Cytioni katalooginumbr 800100), mis sisaldab optimeeritud osmoprotektante ja metaboolseid stabilisaatoreid, et parandada taastumist ja vähendada krüostressi.

NCI-H1299-RFP rakud | 300272

**Thawing and
Culturing Cells**

1. Veenduge, et vial jääb tarnimisel sügavkülmutatud, sest rakud transporditakse kuiva jääga, et säilitada optimaalne temperatuur transpordi ajal.
2. Pärast kättesaamist säilitage krüoviaal kas kohe temperatuuril alla $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, et tagada rakkude terviklikkuse säilimine, või jätkake sammuga 3, kui on vaja koheselt kultiveerida.
3. Kohese kultiveerimise korral sulatage viali kiiresti, kastes selle $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 viali ettevaatlikult ja viige raku suspensioon 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 söötme keskkond ühte T25 kolbi, et soodustada rakkude tõhusat koostoimet ja kasvu.
8. Järgige kehtestatud subkultuuriprotokolle rakuliini jätkuvaks kasvuks ja säilitamiseks, tagades usaldusväärsed katsetulemused.

**Incubation
Atmosphere**

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige vialid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

**Shipping
Conditions**

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige vialid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

NCI-H1299-RFP rakud | 300272

**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 / Geneetiline profiil / HLA

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.