

HaCaT-ras A5 rakud | 300494

Üldine teave

Description

HaCaT-ras A5 rakud on spontaanselt immortaliseeritud, mittetuumoriseeruv inimese naha keratinotsüütide rakuliin, mis on oluline vahend kasvaja mikrokeskkonna interaktsioonide ja nahakartsinoomi progresseerumise uurimisel. Need rakud, mis pärinevad 62-aastaselt kaukaasia mehelt, on läbinud kloonilise selektsiooni ja mutageneesi, mis koos autokriinsete kasvufaktorite regulatsiooniga võimaldab aeglaselt kasvavate, kõrgelt diferentseeritud healoomuliste tsüstiliste kasvujate moodustamist Balb/c-nu/nu hiirtel. See muudab nad väärtuslikuks mudeliks rakkude dünaamika ja kasvujate progresseerumise molekulaarsete mehhanismide uurimiseks in vivo.

HaCaT-ras A5 rakud on eriti kasulikud kasvajakakkude ja ümbritsevate stroomirakkude, sealhulgas fibroblastide, immuunrakkude ja endoteelirakkude vaheliste keeruliste vastastikmõjude selgitamiseks. Neid koostoimeid vahendavad mitmesugused signaalimolekulid, nagu kasvufaktorid, tsütokiinid ja proteaasid, mille hulgas interleukiin-6 (IL-6) mängib kesket rolli. On teada, et IL-6 muutub paljude vähitüüpide puhul düsreguleerituks, peamiselt STAT3 transkriptsioonifaktori üleekspressiooni või püsiva aktiveerimise kaudu.

Uuringud on näidanud, et IL-6 stimuleerimine HaCaT-ras A5 rakkude puhul suurendab märkimisväärselt nende proliferatsiooni JAK/STAT-signaalitee kaudu, samas kui fibroblastide puhul ei ole see mõjutatud, kuna SOCS3, mis on selle tee negatiivne regulaator, pärsib seda tugevamalt. See erinev vastus on kajastatud matemaatilises mudelis, mis kirjeldab STAT3 ja SOCS3 dünaamikat, võimaldades sügavamat arusaamist rakuspetsiifilistest signaalkaskaadidest.

Lisaks ei mõjuta IL-6 mitte ainult otseselt HaCaT-ras A5 rakkude proliferatsiooni, vaid kaudset ka rakukeskkonda selliste kasvufaktorite nagu HGF, KGF, VEGF ja IL-8 võrgustiku aktiveerimise kaudu. Geeniekspressiooni analüüs, mis hõlmas üle 16 000 geeni, näitas, et IL-6 stimulatsioon reguleerib 19 geeni, mis on seotud interferooni signaaliteega nii HaCaT-ras A5 rakkudes kui ka fibroblastides, mis korreleerub fibroblastides täheldatud kasvu pärssimisega.

SerpinB4 otsustava rolli avastamine HaCaT-ras A5 rakkude proliferatsioonis, mida kinnitati siRNA knockdown-katsetega, rõhutab IL-6-i keerukat regulatsiooni nii kasvajakakkudes kui ka stroomirakkudes. Selline terviklik arusaam IL-6 rollidest suurendab võimalusi sihtotstarbeliste ravistrateegiade väljatöötamiseks, mis on suunatud IL-6 signaaliradade moduleerimisele kasvaja mikrokeskkonnas.

Üldiselt pakuvad HaCaT-ras A5 rakud tugevat mudelit kasvujate mikrokeskkonna keerulise vastastikuse mõju uurimiseks, mis sillutab teed uudsetele lähenemisviisidele vähiuuringutes ja ravi arendamisel.

Organism Inimene

Tissue Nahk

Synonyms HaCaT-ras kloon A-5, HaCaT A-5, A-5, A5

Omadused

Age 62 aastat

Gender Mees

HaCaT-ras A5 rakud | 300494

Ethnicity Kaukaasia

Cell type Keratinotsüüdid

Growth properties Kinnipeetav

Regulatiivsed andmed

Citation HaCaT-ras A5 (Cytion katalooginumber 300494)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

CellosaurusAccession CVCL_xK16

GMO Status GMO-S1: See HaCaT-ras A5 liin sisaldab plasmiidist kantud c-Ha-ras onkogeeni konstruktsiooni epiteeli transformatsiooni uuringuteks. See klassifikatsioon kehtib ainult Saksamaal ja võib mujal erineda.

Biomolekulaarsed andmed

Protein expression P53 (+), CEA (+),

Tumorigenic Healoomuliste kasvajate teke Balb/c-nu/nu hiirtel.

Karyotype Aneuploidne (hüpotetraploidne)

Töötlemine

Culture Medium DMEM, w: 4,5 g/L glükoosi, w: 4 mM L-glutamiini, w: 3,7 g/L NaHCO₃, w: 1,0 mM naatriumpüruvaati (Cytioni artikli number 820300a)

Supplements Täiendada söötme 10% FBS-ga

Dissociation Reagent EDTA (varu: 0,05%) ja trüpsiini (varu: 0,1%) 1:1 segu tuleb valmistada iga kord enne rakkude eraldamist, kasutades Ca²⁺ ja Mg²⁺ -vaba PBS-i, et tagada füsioloogiline osmolaarsus. Valmis trüpsiini/EDTA segusid ei soovitata kasutada, kuna see võib põhjustada rakuklumpide tekkimist. Alternatiivina võib kasutada trüpsiini/EDTA asemel TrypLETM Express (Life Technologies). Tuleb järgida tootja protokollid.

HaCaT-ras A5 rakud | 300494

Subculturing

1. **Visake vana meedium ära:** Eemaldage kolbidest vana keskkond.
2. **Peske rakud:** T25 kolvidesse lisatakse 3-5 ml PBS-i (ilma kaltsiumi ja magneesiumita) või 5-10 ml T75 kolvidesse, et pesta kinni jäänud rakke.
3. **Lisage EDTA lahus:** Katke rakukihi täielikult värskest valmistatud 0,05% EDTA lahusega - kasutage 1-2 ml T25 kolvidesse ja 2,5 ml T75 kolvidesse.
4. **Inkubeerimine:** Inkubeerige kolvid 37 °C juures 10 minutit.
5. **Lisage trüpsiini/EDTA lahus:** Pärast inkubeerimist lisage kolvidesse värskest valmistatud trüpsiini/EDTA lahus (0,05% trüpsiin, 0,025% EDTA), tagades, et rakud on täielikult kaetud - kasutage 1 ml T25 kolbide puhul ja 2,5 ml T75 kolbide puhul.
6. **Jälgige eraldumist:** Jälgige rakke, mis peaksid eralduma 1-2 minuti jooksul.
7. **Neutraliseerige trüpsiin:** Lisage FBS-i sisaldavat rakukultuurikeskkonda, et peatada trüpsiini aktiivsus.
8. **Viige rakud üle:** Doseerige raku suspensioon uutesse kolvidesse, mis on eelnevalt täidetud värskes kasvukeskkonnaga.

Seeding density

 1×10^4 rakku/cm²

Fluid renewal

2 korda nädalas

Freeze medium

Krüsosäilitusvedelikusena 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.

HaCaT-ras A5 rakud | 300494**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.

HaCaT-ras A5 rakud | 300494

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.

HLA alleles

A*: '31:01:02
B*: '40:01:02, '51:01:01
C*: '03:04:01, '15:02:01
DRB1*: '04:01:01, '15:01:01G
DQA1*: '01:02:01, '03:03:01
DQB1*: '03:01:01, '06:02:01
DPB1*: '03:01:01G, '04:01:01G
E: '01:03:01, '01:03:02