

imWilms1 rakud | 300412

Üldine teave

Description

Wilms1 rakuliin on algselt saadud Wilmsi primaarsest kasvajast, mis saadi patsiendilt, kellel diagnoositi suured kahepoolsed neerukasvajad, mis on Wilmsi kasvaja (nefroblastoomi) iseloomulik esinemisviis. Selles rakuliinis on homosügootne mõttetu mutatsioon WT1 geenis (c.149 C>A, p.S50X), mis põhjustab kärbitud, mittefunktsionaalse WT1 valgu teket. WT1 on neerude arengus kriitilise tähtsusega geen ja selle mutatsioon on tihedalt seotud Wilmsi kasvaja patogeneesiga, eriti stromaalse diferentseerumisega kasvajate puhul. Wilms1 rakkudel on stabiilne kariotüüp ilma oluliste kromosoomianomaaliateta ning neid iseloomustab mesenhüümne fenotüüp, mis ekspresseerib vimentini, kuid millel puuduvad epiteeli markerid, nagu tsütokeratiin. Liinil on piiratud, kuid märkimisväärne võime mesenhüümiliseks diferentseerumiseks, sealhulgas võime diferentseeruda teatud tingimustel lihasarnasteks rakkudeks, mis muudab selle oluliseks mudeliks WT1 mutatsioonide molekulaarsete tagajärgede uurimiseks.

Et ületada primaarsete Wilms1-rakkude piiratud eluiga, loodi imWilms1 rakuliin, viies algsetesse kasvajarakkudesse sisse kolmekordse mutandi SV40 suure T antigeeni (U19dI89-97tsA58), mis hõlbustab nende immortaliseerimist. See modifikatsioon võimaldab imWilms1 rakkudel piiramatult paljuneda, säilitades samal ajal kromosomaalse stabiilsuse, pakkudes seega usaldusväärset mudelit pikaajalisteks uuringuteks. Immortaliseeritud imWilms1-rakkudel on jätkuvalt sama WT1-mutatsioon ja nad säilitavad Wilms1 vanemliini mesenhüümilised omadused.

Lisaks geneetilistele ja fenotüüpilistele omadustele on imWilms1 rakuliini ulatuslikult analüüsitud selle signaaliradade aktiivsuse suhtes. Proteoomilised uuringud on näidanud mitmete retseptoritürosiini kinaaside (RTK), sealhulgas EGFR, PDGFR β ja AXL fosforüleerimist ja aktiveerimist ning MAPK-signaaliradade allavoolu aktiveerimist. Nende radade järjepidev aktiveerimine imWilms1 rakkudes rõhutab nende tähtsust Wilmsi kasvaja sihtotstarbeliste ravistrateegiate uurimisel. Üldiselt on imWilms1 usaldusväärne ja pikaajaline mudel Wilmsi kasvaja arengu ja progresseerumise aluseks olevate molekulaarsete mehhanismide uurimiseks, eriti nende, mis on tingitud WT1 mutatsioonidest ja kõrvalekalduvatest signaaliradadest.

Organism Inimene

Tissue Neerud

Disease Wilmsi kasvaja

Synonyms IM-WT-1

Omadused

Age 10 kuud

Gender Naised

Ethnicity Kaukaasia

imWilms1 rakud | 300412

Morphology Spindlikujuline

Cell type Wilmsi rakud

Growth properties Kinnipeetav

Regulatiivsed andmed

Citation imWilms1 (Cytioni katalooginumber 300412)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

CellosaurusAccession CVCL_A5SN

GMO Status GMO-S1: See imWilms1 inimese Wilmsi kasvaja liin sisaldab kolmekordselt mutantset SV40 T-antigeeni kassetti, mis võimaldab tingimuslikku immortaliseerimist nefroblastoomi uurimiseks. See klassifikatsioon kehtib ainult Saksamaal ja võib mujal erineda.

Biomolekulaarsed andmed

Mutational profile WT1 mutatsiooni staatus: homosügootne c. 149 C>A, p.S50x, LOH: 11p11-11pter, CTNNB1 mutatsiooni staatus: heterosügootne TCT>TTT, p.S45F

Töötlemine

Culture Medium MSCGM komplekt (Lonza)

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 1 kuni 2 korda nädalas

imWilms1 rakud | 300412

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 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°C , et tagada rakkude terviklikkuse säilimine, või jätkake sammuga 3, kui on vaja koheselt kultiveerida.
3. Kohese kultiveerimise korral sulatage vial 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 vial ettevaatlikult ja viige rakususpensioon ettevaatlikult segades 15 ml tsentrifuugitorusse, mis sisaldab 8 ml toatemperatuuril olevat kasvukeskkonda.
6. Rakkude eraldamiseks tsentrifuugige segu 300 x 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°C , 5% CO_2 , niisutatud atmosfäär.

Flask Coating

Optimaalse kinnitumise ja elujõulisuse tagamiseks pärast sulatamist soovitame kasutada **kollageeniga kaetud koldeid või plaate**.

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 vialid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

imWilms1 rakud | 300412

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 / Geneetiline profiil / HLA

Sterility

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

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

HLA alleles

A*: '03:01:01, '24:02:01
B*: '35:03:01, '38:01:01
C*: '12:03:01
DRB1*: '07:01:01, '14:54:01
DQA1*: '01:04:01, '02:01:01
DQB1*: '02:02:01, '05:03:01
DPB1*: '02:01:02G, '04:02:01G
E: '01:03:01, '01:03:02