

**B-LCL-HROC69-solut | 300864****Yleisiä tietoja****Description**

B-LCL-HROC69 on Epstein-Barr-viruksen (EBV) avulla ikuistettu B-lymfoblastoidinen solulinja, joka on perustettu primaarisesta kolorektaalaisesta karsinoomasta otetusta näytteestä HROC69 eristetyistä tuumoriin tunkeutuneista B-soluista (TiBc). Emotuumori oli peräisin aikuiselta miespotilaalta, jolla oli oikeanpuoleinen kolorektaalinen karsinooma, joka oli tyypiltään tavanomainen sporadinen ja pitkälle edennyt. B-solut eristettiin vastaleikatusta kasvainkudoksesta ja immortalisoitiin ex vivo käyttämällä EBV:tä tuottavan B95/8-marmosettisolulinjan supernatanttia syklosporiini A:n läsnä ollessa T- ja NK-solujen kasvun estämiseksi. EBV-transformoitujen B-solukloonien kasvu tapahtui tyypillisesti muutaman viikon kuluessa, ja kloonaisuus vahvistettiin immunoglobuliinin raskas- ja kevytketjujen geenien uudelleenjärjestäytymisanalyysillä käyttäen BIOMED-2-multiplex-PCR-protokollia.

B-LCL-HROC69 erittää immunoglobuliini A:ta (IgA), mikä on määritetty isotyypikohtaisella ELISA-menetelmällä pitkäaikaisista viljelyjen supernatantista. Toisin kuin useat rinnakkain perustetut IgG:tä tuottavat TiBc-linjat, HROC69:stä peräisin olevaa IgA:ta ei karakterisoitu tarkemmin tuumorisolujen sitoutumisen osalta alkuperäisissä toiminnallisissa seulontatesteissä. Tärkeää on, että B-soluviljelmissä ei tapahtunut spontaania kasvua ilman eksogeenistä EBV:tä, mikä osoittaa, että immortalisaatio on in vitro -ilmiö eikä seurausta latentista EBV-infektiosta in vivo. B-LCL-HROC69 edustaa siten monoklonaalista, antigeenikokemusta omaavaa tuumoriin tunkeutuvaa B-solumallia, joka soveltuu humoraalisen immuunivasteen tutkimiseen kolorektaalisyövän mikroympäristössä ja paikallisesti laajentuneiden B-solukloonien tunnistamisen tuumoriin liittyvien antigeenien potentiaaliseen tunnistamiseen.

**Organism** Ihminen**Tissue** Perifeerinen veri**Disease** Syöpä**Synonyms** B-LCL C069, Bc HROC69, TiBcHROC69**Ominaisuuudet****Age** 62 vuotta**Gender** Mies**Ethnicity** Kaukasialainen**Morphology** Pyöreät kennot**Cell type** B-lymfoblasti

**B-LCL-HROC69-solut | 300864****Growth properties**

Jousitus

**Sääntelytiedot****Citation** B-LCL-HROC69 (Cytionin luettelonumero 300864)**Biosafety level** 2**NCBI\_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL\_YD53**Biomolekyylitiedot****Surface antigens** CD19**Viruses** Muuntaja: EBV**Käsittely****Culture Medium** RPMI 1640, w: 2,0 mM stabiilia glutamiinia, w: 2,0 g/L NaHCO<sub>3</sub> (Cytionin artikkelinumero 820700a)**Supplements** Täydennetään elatusainetta 10 % lämpöinaktivoidulla FBS:llä**Subculturing** Homogenoi solususpensio varovasti pullossa pipetoimalla ylös ja alas, ota sitten edustava näyte solutiheyden määrittämiseksi millilitraa kohti. Laimenna suspensio tuoreella viljelyalustalla solupitoisuudeksi  $1 \times 10^5$  solua/ml ja jaa säädetty suspensio uusiin pulloihin jatkokäsittelyä varten.**Freeze medium** Kryosäilytysmediana käytämme täydellistä kasvualustaa (mukaan lukien FBS) + 10 % DMSO:ta riittävän sulatuksen jälkeisen elinkelpoisuuden varmistamiseksi tai CM-1:tä (Cytionin luettelonumero 800100), joka sisältää optimoituja osmoprotektantteja ja metabolisia stabilisaattoreita, jotka parantavat elpymistä ja vähentävät kryosäilytyksen aiheuttamaa stressiä.

## B-LCL-HROC69-solut | 300864

### Thawing and Culturing Cells

1. Varmista, että injektiopullo pysyy syväjäädetyttynä toimitettaessa, sillä solut kuljetetaan kuivajäädessä, jotta optimaalinen lämpötila säilyy kuljetuksen aikana.
2. Vastaanotettaessa kryopullo joko säilytetään välittömästi alle -150 °C:n lämpötilassa solujen eheyden säilyttämiseksi tai edetään vaiheeseen 3, jos tarvitaan välitöntä viljelyä.
3. Välitöntä viljelyä varten sulata injektiopullo nopeasti upottamalla se 37 °C:n vesihauteeseen, jossa on puhdasta vettä ja mikrobilääkettä, ja sekoittamalla sitä varovasti 40-60 sekunnin ajan, kunnes jäädästä on jäljellä pieni jäämöhkäle.
4. Suorita kaikki seuraavat vaiheet steriileissä olosuhteissa virtaushupussa ja desinfioi kryopullo 70-prosenttisella etanolilla ennen avaamista.
5. Avaa desinfioitu injektiopullo varovasti ja siirrä solususpensio 15 ml:n sentrifugiputkeen, joka sisältää 8 ml huoneenlämpöistä elatusainetta, varovasti sekoittaen.
6. Sentrifugoi seosta 300 x g:n voimakkuudella 3 minuutin ajan solujen erottamiseksi ja hävitä varovasti supernatantti, joka sisältää jäännöspakastusmediumia.
7. Suspendoidaan solupelletti varovasti uudelleen 10 ml:aan tuoretta elatusainetta. Jos solut ovat tarttuvia, jaa suspensio kahden T25-kolvin kesken; jos kyseessä ovat suspensioviljelmät, siirrä kaikki väliaine yhteen T25-kolviin solujen tehokkaan vuorovaikutuksen ja kasvun edistämiseksi.
8. Noudata vakiintuneita aliviljelyprotokollia solulinjan jatkuvan kasvun ja ylläpidon varmistamiseksi ja luotettavien kokeellisten tulosten varmistamiseksi.

### Incubation Atmosphere

37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ , kostutettu ilmakehä.

### Flask Coating

Ei mitään

### Freezing Procedure

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäädessä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

### Shipping Conditions

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäädessä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

## B-LCL-HROC69-solut | 300864

### Storage Conditions

Pitkäaikaissäilytystä varten injektiopullot asetetaan höyryfaasissa olevaan nestemäiseen tyypeen noin -150 - -196 °C:een. Säilytys -80 °C:ssa on hyväksyttävää vain lyhyenä välivaiheena ennen siirtoa nestemäiseen tyypeen.

## Laadunvalvonta ja molekyylianalyysi

### Sterility

Mykoplasmakontaminaatio suljetaan pois sekä PCR-pohjaisilla määrittelyillä että luminesenssiin perustuvilla mykoplasman osoitusmenetelmillä.

Bakteeri-, sieni- tai hiivakontaminaation välttämiseksi soluviljelmät tarkastetaan päivittäin silmämääräisesti.