

Wilms6-solut | 300415

Yleisiä tietoja

Description

Wilms6-solulinja perustettiin primaarisesta Wilmsin kasvaimesta, joka oli peräisin lapsipotilaalta, jolla oli itulinjan WT1-mutaatio. Tämä solulinja on määritelty homotsygoottisen nonsense-mutaation perusteella WT1-geenissä (c.1168 C>T, p.R390X), joka johtaa tyypistettyyn ja toimimattomaan WT1-proteiiniin. WT1 on kriittinen munuaisten kehityksen säätelijä, ja sen häviäminen liittyy vahvasti Wilmsin kasvaimen, erityisesti tapauksissa, joissa esiintyy mesenkymaalista erilaistumista. Wilms6-solulinja on tärkeä malli täydellisen WT1:n menetyksen kasvainvaikutusvaikutusten tutkimiseen erityisesti sellaisten kasvainten yhteydessä, joilla on sekä epiteeli- että mesenkymaalisia piirteitä.

Wilms6-soluissa on myös mutaatio CTNNB1-geenissä, joka vaikuttaa erityisesti seriini 45:een (p.S45F), joka on keskeinen fosforylaatiokohta, joka säätelee β -kateniinin hajoamista. Tämä mutaatio johtaa β -kateniinin stabiloitumiseen ja ydinkertymään, mikä johtaa Wnt-signaalintireitin konstitutiiviseen aktivoitumiseen. Wnt-signalisaation poikkeava aktivoituminen on tunnetusti solujen lisääntymisen ja kasvainten synnyn ajuri Wilmsin kasvaimissa, joten Wilms6 on arvokas väline WT1-mutaatioita sisältävissä kasvaimissa tapahtuvan Wnt-reitin säätelyhäiriön roolin tutkimiseen.

Fenotyybiltään Wilms6-solut ovat mesenkymaalisen morfologian omaavia, ja niissä ilmentyy voimakkaasti vimentini, mutta epiteelin merkkiaineita, kuten sytokeratiinia, ei esiinny, mikä kuvastaa alkuperäisen kasvaimen stroomaalista luonnetta. Näillä soluilla on osoitettu olevan rajallinen mutta huomattava erilaistumispotentiaali, mukaan lukien kyky erilaistua lihaksen kaltaisiksi soluiksi tietyissä olosuhteissa, mikä heijastaa joissakin Wilmsin kasvaimissa havaittua mesenkymaalista erilaistumista. Wilmsin6 proteomitutkimuksissa on tunnistettu useiden reseptorityrosiinikinaasien (RTK), kuten PDGFR β :n ja AXL:n, aktivoituminen, ja ne osallistuvat solujen eloonjäämisen, proliferaation ja migraation edistämiseen. MAPK:n ja PI3K/AKT:n kaltaisten signaalireittien aktivoituminen edelleen korostaa tämän solulinjan aggressiivista luonnetta.

Kaiken kaikkiaan Wilms6-solulinja toimii ratkaisevana mallina Wilmsin kasvainten kehittymisen taustalla olevien molekyylimekanismien tutkimisessa, erityisesti tapauksissa, joissa WT1:n täydellinen menetys yhdistettynä Wnt-signaalin aktivoitumiseen. Sen geneettiset ja fenotyyppiset ominaisuudet tekevät siitä erinomaisen alustan WT1:n puutteen ja poikkeavien signaalireittien välisen vuorovaikutuksen tutkimiseen, mikä antaa tietoa tämän aggressiivisen kasvaintyyppin mahdollisista hoitokohteista.

Organism Ihminen

Tissue Munuaiset

Disease Wilmsin kasvain

Applications In vitro -soluviljelymalli. Biokemialliset tutkimukset

Ominaisuudet

Age 15 kuukautta

Gender Mies

Wilms6-solut | 300415**Ethnicity** Kaukasialainen**Morphology** Karanmuotoinen**Cell type** Wilmsin solut**Growth properties** Tarttuva**Säätelytiedot****Citation** Wilms6 (Cytionin luettelonumero 300415)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_A5SI**Biomolekyylitiedot****Mutational profile** WT1-mutaation status: homotsygoottinen c.1168C>T, p.R390x, LOH: 11p11-11pter, CTNNB1-mutaation status: homotsygoottinen del TCT, p.DS45**Käsittely****Culture Medium** MSCGM-pakkaus (Lonza)**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Poista vanha väliaine tarttuneista soluista ja pese ne PBS:llä, josta puuttuu kalsiumia ja magnesiumia. Käytä T25-pulloissa 3-5 ml PBS:ää ja T75-pulloissa 5-10 ml. Peitä sitten solut kokonaan Accutase-valmisteella, käyttäen 1-2 ml T25-pulloissa ja 2,5 ml T75-pulloissa. Anna solujen inkuboitua huoneenlämmössä 8-10 minuuttia solujen irtoamiseksi. Inkuboinnin jälkeen solut sekoitetaan varovasti 10 ml:n väliaineella niiden resuspendoimiseksi ja sentrifugoidaan sitten 300xg:n nopeudella 3 minuutin ajan. Hävitä supernatantti, suspendoi solut uudelleen tuoreessa väliaineessa ja siirrä ne uusiin pulloihin, jotka sisältävät jo tuoretta väliaineita.

Wilms6-solut | 300415

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 osmoprotectantteja ja metabolisia stabilisaattoreita, jotka parantavat elpymistä ja vähentävät kryosäilytyksen aiheuttamaa stressiä.

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 antimikrobista ainetta, 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-prosenttisellä 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 % 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.

Wilms6-solut | 300415

Shipping Conditions

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäädssä 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.

Storage Conditions

Pitkäaikaisäilytystä 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 / Geneettinen profiili / HLA

Sterility

Mykoplasmaakontaminaatio suljetaan pois sekä PCR-pohjaisilla määrityksillä että luminesenssiin perustuvilla mykoplasman osoitusmenetelmillä.

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

HLA-alleelit

A*: '02:05:01, '29:01:01

B*: '07:05:01, '13:02:01

C*: '06:02:01, '15:05:02

DRB1*: '07:01:01, '10:01:01

DQA1*: '01:05:01, '02:01:01

DQB1*: '02:02:01, '05:01:01

DPB1*: '04:02:01, '17:01:01

E: '01:01:01