

Cellules NCI-H1299-RFP | 300272

Informations générales

Description

Les cellules NCI-H1299 RFP, modifiées pour inclure un rapporteur dans le gène DAPK1, ne sont pas seulement utiles pour étudier l'activation de gènes spécifiques, mais permettent également de mieux comprendre comment les cellules réagissent aux médicaments épigénétiques dans leur ensemble. En utilisant une technique appelée Cap Analysis of Gene Expression (CAGE), les chercheurs ont pu détailler les changements au niveau du démarrage de la transcription dans le génome en réponse à des traitements par DNMTi (DAC), HDACi (SAHA ou SB939), ou leurs combinaisons. Cette méthode révèle non seulement la réactivation attendue du gène DAPK1, mais aussi l'émergence de nouveaux sites de démarrage de la transcription, appelés TSS non annotés induits par le traitement (TINAT), en particulier sous traitement médicamenteux. Ces nouveaux sites de démarrage sont généralement situés dans des régions du génome qui ne produisent habituellement pas de protéines et conduisent à la création de nouvelles molécules d'ARN qui pourraient potentiellement coder pour des protéines.

Une analyse plus poussée montre que ces nouvelles molécules d'ARN peuvent parfois fusionner avec des molécules existantes pour former ce que l'on appelle des transcrits de fusion TINAT-exon. Selon la manière dont ces transcrits sont épissés, ils peuvent se traduire par de nouvelles protéines atypiques. Ce processus a été confirmé par des techniques de laboratoire qui démontrent que ces transcrits peuvent effectivement conduire à la production de nouvelles formes de protéines. Ces protéines peuvent interagir de manière anormale au sein de la cellule ou être reconnues comme étrangères par le système immunitaire, ce qui pourrait constituer de nouvelles cibles pour les traitements anticancéreux.

L'activation de ces TINATs implique des changements complexes dans la méthylation de l'ADN et les modifications des histones, illustrant une interaction complexe entre ces facteurs épigénétiques sous traitement médicamenteux. En particulier, l'utilisation combinée de DAC et de SB939 a un effet plus important, stimulant l'expression de ces nouveaux transcrits plus que lorsque l'un ou l'autre des médicaments est utilisé seul. La compréhension de ces interactions et de leurs résultats aide à clarifier la façon dont les thérapies épigénétiques modifient le comportement des cellules et ouvre la voie à de nouveaux traitements contre le cancer qui tirent parti de ces changements moléculaires complexes.

Organism

Humain

Tissue

Poumon

Disease

Carcinome à grandes cellules

Metastatic site

Localisation de la tumeur primaire (poumon)

Applications

Recherche en thérapie épigénétique ; réactivation du gène DAPK1 ; études sur la réponse aux médicaments DNMTi et HDACi ; sites de début de transcription non annotés induits par le traitement (TINAT) ; transcriptomique CAGE ; analyse des transcrits de fusion ; production de protéines atypiques à partir de promoteurs cryptiques ; criblage de combinaisons de médicaments épigénétiques

Caractéristiques

Cellules NCI-H1299-RFP | 300272**Morphology** De type épithélial**Cell type** Cellules épithéliales**Growth properties** Adhérent**Données réglementaires****Citation** NCI-H1299-EGFP, avec résistance au G418 et gène rapporteur désactivé (DKFZ n° P-1045) (référence Cytion 300272)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_XB25**GMO Status** GMO-S1 : Ce dérivé de la lignée NCI-H1299 (DKFZ n° P-1045) contient un rapporteur EGFP silencé de manière stable au niveau du locus DAPK1, ce qui permet de mesurer la réactivation épigénétique. Cassette de résistance au G418 présente. Cette classification s'applique uniquement en Allemagne et peut varier dans d'autres pays.**Données biomoléculaires****Manipulation****Culture Medium** RPMI 1640, w : 2.0 mM Glutamine stable, w : 2.0 g/L NaHCO₃ (numéro d'article Cytion 820700a)**Supplements** Compléter le milieu avec 10% de FBS**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** environ 24 à 36 heures

Cellules NCI-H1299-RFP | 300272

Subculturing Retirer l'ancien milieu des cellules adhérentes et les laver avec du PBS dépourvu de calcium et de magnésium. Pour les flacons T25, utiliser 3-5 ml de PBS, et pour les flacons T75, 5-10 ml. Ensuite, recouvrir complètement les cellules avec Accutase, en utilisant 1 à 2 ml pour les flacons T25 et 2,5 ml pour les flacons T75. Laisser les cellules incuber à température ambiante pendant 8-10 minutes pour les détacher. Après incubation, mélanger délicatement les cellules avec 10 ml de milieu pour les remettre en suspension, puis centrifuger à 300xg pendant 3 minutes. Jeter le surnageant, remettre les cellules en suspension dans du milieu frais et les transférer dans de nouveaux flacons contenant déjà du milieu frais.

Split ratio 1 à 5

Seeding density 1 à 3×10^4 cellules/cm²

Fluid renewal 2 à 3 fois par semaine

Freeze medium Comme milieu de cryoconservation, nous utilisons un milieu de croissance complet (comprenant du FBS) + 10 % de DMSO pour une viabilité adéquate après décongélation, ou CM-1 (numéro de catalogue 800100 de Cytion), qui comprend des osmoprotectants et des stabilisateurs métaboliques optimisés pour améliorer la récupération et réduire le stress induit par la cryogénisation.

Cellules NCI-H1299-RFP | 300272

Thawing and Culturing Cells

1. Confirmer que le flacon est toujours congelé à la livraison, car les cellules sont expédiées sur de la glace sèche pour maintenir des températures optimales pendant le transport.
2. Dès réception, soit conserver immédiatement le cryovial à des températures inférieures à -150°C pour assurer la préservation de l'intégrité cellulaire, soit passer à l'étape 3 si une mise en culture immédiate est nécessaire.
3. Pour une mise en culture immédiate, décongeler rapidement le flacon en l'immergeant dans un bain-marie à 37°C avec de l'eau propre et un agent antimicrobien, en l'agitant doucement pendant 40 à 60 secondes jusqu'à ce qu'il ne reste qu'un petit amas de glace.
4. Effectuer toutes les étapes suivantes dans des conditions stériles sous une hotte à flux, en désinfectant le cryovial avec de l'éthanol à 70 % avant de l'ouvrir.
5. Ouvrir soigneusement le flacon désinfecté et transférer la suspension cellulaire dans un tube à centrifuger de 15 ml contenant 8 ml de milieu de culture à température ambiante, en mélangeant doucement.
6. Centrifuger le mélange à 300 x g pendant 3 minutes pour séparer les cellules et jeter soigneusement le surnageant contenant le milieu de congélation résiduel.
7. Remettre doucement en suspension le culot cellulaire dans 10 ml de milieu de culture frais. Pour les cellules adhérentes, répartir la suspension entre deux flacons de culture T25 ; pour les cultures en suspension, transférer tout le milieu dans un seul flacon T25 afin de favoriser une interaction et une croissance efficaces des cellules.
8. Respecter les protocoles de sous-culture établis pour une croissance et un entretien continus de la lignée cellulaire, garantissant ainsi des résultats expérimentaux fiables.

Incubation Atmosphere

37°C, 5% CO_2 , atmosphère humidifiée.

Flask Coating

Aucun

Freezing Procedure

Les lignées cellulaires cryoconservées sont expédiées sur glace sèche dans des emballages isolés et validés, avec suffisamment de réfrigérant pour maintenir une température d'environ -78 °C tout au long du transport. À la réception, inspecter immédiatement le conteneur et transférer sans délai les flacons dans un lieu de stockage approprié.

Cellules NCI-H1299-RFP | 300272

Shipping Conditions

Les lignées cellulaires cryoconservées sont expédiées sur glace sèche dans des emballages isolés et validés, avec suffisamment de réfrigérant pour maintenir une température d'environ -78 °C tout au long du transport. À la réception, inspecter immédiatement le conteneur et transférer sans délai les flacons dans un lieu de stockage approprié.

Storage Conditions

Pour une conservation à long terme, placer les flacons dans de l'azote liquide en phase vapeur à une température comprise entre -150 et -196 °C environ. Le stockage à -80 °C n'est acceptable qu'en tant qu'étape intermédiaire de courte durée avant le transfert dans l'azote liquide.

Contrôle qualité et analyse moléculaire

Sterility

La contamination par les mycoplasmes est exclue à l'aide de tests basés sur la PCR et de méthodes de détection des mycoplasmes basées sur la luminescence.

Pour s'assurer de l'absence de contamination bactérienne, fongique ou levurienne, les cultures cellulaires font l'objet d'inspections visuelles quotidiennes.

Profil STR

Amelogenin: x,y
PEZ6: LCLC-97TM1