

NCI-H1299-RFP sejtek | 300272

Általános információk

Description

Az NCI-H1299 RFP sejtek, amelyeket úgy módosítottak, hogy a DAPK1 génben egy riportert tartalmazzanak, nem csak a specifikus génaktiváció tanulmányozására alkalmasak, hanem szélesebb körű megértést is nyújtanak arról, hogy a sejtek hogyan reagálnak az epigenetikus gyógyszerekre globálisan. A Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) nevű technika alkalmazásával a kutatók képesek voltak részletesen bemutatni, hogy a DNMT1 (DAC), HDACi (SAHA vagy SB939), illetve ezek kombinációjával végzett kezelések hatására a genomban hol kezdődik a transzkripció. Ez a módszer nemcsak a DAPK1 gén várható reaktiválódását tárja fel, hanem új transzkripcióindítási helyek, az úgynevezett kezelés által indukált, nem jegyzett TSS-ek (TINAT) megjelenését is, különösen gyógyszeres kezelés alatt. Ezek az új indítóhelyek jellemzően a genom olyan régióiban találhatóak, amelyek általában nem termelnek fehérjéket, és új RNS-molekulák létrejöttéhez vezetnek, amelyek potenciálisan fehérjéket kódolhatnak.

További elemzések azt mutatják, hogy ezek az új RNS-molekulák néha összeolvadhatnak a már meglévővel, és úgynevezett TINAT-exon fúziós transzkriptumokat alkotnak. Attól függően, hogy ezek a transzkriptumok hogyan splicereződnek, új, atipikus fehérjékké alakulhatnak. Ezt a folyamatot laboratóriumi technikákkal igazolták, amelyek bizonyítják, hogy ezek az átiratok valóban új fehérjeformák előállításához vezethetnek. Ezek a fehérjék rendellenes kölcsönhatásba léphetnek a sejten belül, vagy az immunrendszer idegen anyagként ismerheti fel őket, ami új célpontokat kínálhat a rákterápia számára.

Ezeknek a TINAT-oknak az aktiválása bonyolult változásokat von maga után mind a DNS-metilációban, mind a hisztonmódosulásokban, ami a gyógyszeres kezelés alatt álló epigenetikai tényezők közötti összetett kölcsönhatást mutatja. Különösen a DAC és az SB939 kombinált alkalmazása mutat nagyobb hatást, jobban fokozva ezen új transzkriptek expresszióját, mint amikor bármelyik gyógyszert önmagában alkalmazzák. Ezeknek a kölcsönhatásoknak és eredményeiknek a megértése segít tisztázni, hogy az epigenetikai terápiák hogyan változtatják meg a sejtek viselkedését, és új lehetőségeket nyit meg olyan új rákkezelések számára, amelyek kihasználják ezeket az összetett molekuláris változásokat.

Organism Emberi

Tissue Tüdő

Disease Nagysejtes karcinóma

Jellemzők

Morphology Epithelszerű

Growth properties Adherent

Szabályozási adatok

Citation NCI-H1299-EGFP, G418-rezisztens és elnémított riporterral (DKFZ # P-1045) (Cytion katalógusszám: 300272)

NCI-H1299-RFP sejtek | 300272

Biosafety level 1**NCBI_TaxID** 9606**Biomolekuláris adatok****A kezelése****Culture Medium** RPMI 1640, w: 2,0 mM stabil glutamin, w: 2,0 g/L NaHCO₃ (Cytion 820700a cikkszám)**Supplements** A táptalajt egészítjük ki 10% FBS-szel**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Távolítsa el a régi táptalajt a megtapadt sejtekről, és mossa őket kalcium- és magnéziummentes PBS-szel. T25-ös lombikokhoz 3-5 ml PBS-t, T75-ös lombikokhoz pedig 5-10 ml-t használjunk. Ezután fedjük be a sejteket teljesen Accutase-zal, T25 lombikok esetében 1-2 ml-t, T75 lombikok esetében 2,5 ml-t használva. A sejteket 8-10 percig hagyjuk szobahőmérsékleten inkubálni, hogy leváljanak. Az inkubálás után óvatosan keverjük össze a sejteket 10 ml tápfolyadékkal, hogy reszuszpendáljuk őket, majd centrifugáljuk 300xg-nél 3 percig. Dobja el a felülúszót, szuszpendálja újra a sejteket friss tápfolyadékban, és helyezze át őket új lombikokba, amelyek már friss tápfolyadékot tartalmaznak.**Fluid renewal** hetente 2-3 alkalommal**Freeze medium** Krioprezerváló táptalajként teljes növekedési táptalajt (beleértve az FBS-t) + 10% DMSO-t használunk a megfelelő kiolvasztás utáni életképesség érdekében, vagy CM-1-et (Cytion katalógusszám: 800100), amely optimalizált ozmoprotektánsokat és metabolikus stabilizátorokat tartalmaz a regenerálódás fokozása és a krio-indukált stressz csökkentése érdekében.

NCI-H1299-RFP sejtek | 300272

**Thawing and
Culturing Cells**

1. Ellenőrizze, hogy az injekciós üveg a szállításkor mélyhűtött marad-e, mivel a sejteket szárazjégen szállítják, hogy a szállítás során az optimális hőmérsékletet fenntartsák.
2. Átvételt követően vagy azonnal tárolja a krioampullát -150 °C alatti hőmérsékleten a sejtek integritásának megőrzése érdekében, vagy folytassa a 3. lépéssel, ha azonnali tenyésztésre van szükség.
3. Azonnali tenyésztés esetén gyorsan fel kell olvasztani az injekciós üveget úgy, hogy tiszta vízzel és antimikrobiális szerrel ellátott 37 °C -os vízfürdőbe merítjük, és 40-60 másodpercig óvatosan kevergetjük, amíg egy kis jégcsomó nem marad.
4. Az összes további lépést steril körülmények között, áramlásos elszívóban végezzük el, és nyitás előtt fertőtlenítsük a kriofülkét 70%-os etanollal.
5. Óvatosan nyissa fel a fertőtlenített fiolát, és a sejtuszpenziót óvatosan összekeverve helyezze át egy 15 ml-es centrifugacsőbe, amely 8 ml szobahőmérsékletű táptalajt tartalmaz.
6. Centrifugáljuk az elegyet $300 \times g$ -n 3 percig a sejtek szétválasztásához, és óvatosan dobjuk el a maradék fagyasztóközeget tartalmazó felülúszót.
7. Óvatosan szuszpendáljuk újra a sejt pelletet 10 ml friss táptalajban. Adhezív sejtek esetében ossza a szuszpenziót két T25-ös tenyésztőlombik között; szuszpenziós kultúrák esetében az összes tápfolyadékot tegye át egy T25-ös lombikba a hatékony sejtkölcsönhatás és növekedés elősegítése érdekében.
8. A sejt vonal folyamatos növekedése és fenntartása érdekében tartsa be a megállapított szubkultúra protokollokat, biztosítva a megbízható kísérleti eredményeket.

**Incubation
Atmosphere**

37 °C , 5% CO_2 , párasított légkör.

Flask Coating

Nincs

**Freezing
Procedure**

A kriokonzervált sejt vonalakat szárazjégen, validált, szigetelt csomagolásban szállítják, elegendő hűtőközeggel, hogy a szállítás során a hőmérsékletet körülbelül -78 °C -on tartsák. Átvételkor azonnal vizsgálja meg a tárolóedényt, és haladéktalanul helyezze át az injekciós üvegeket a megfelelő tárolóhelyre.

**Shipping
Conditions**

A kriokonzervált sejt vonalakat szárazjégen, validált, szigetelt csomagolásban szállítják, elegendő hűtőközeggel, hogy a szállítás során a hőmérsékletet körülbelül -78 °C -on tartsák. Átvételkor azonnal vizsgálja meg a tárolóedényt, és haladéktalanul helyezze át az injekciós üvegeket a megfelelő tárolóhelyre.

NCI-H1299-RFP sejtek | 300272

Storage Conditions

Hosszú távú tartósítás céljából helyezze az üvegeket gőzfázisú folyékony nitrogénbe, körülbelül -150 és -196 °C közötti hőmérsékleten. A -80 °C-on történő tárolás csak rövid átmeneti lépésként fogadható el a folyékony nitrogénbe való átvitel előtt.

Minőségellenőrzés / Genetikai profil / HLA

Sterility

A mikoplazma-szennyeződést mind a PCR-alapú vizsgálatokkal, mind a lumineszcencia-alapú mikoplazma-kimutatói módszerekkel kizárják.

A bakteriális, gombás vagy élesztőgombás szennyeződés elkerülése érdekében a sejt kultúrákat napi vizuális ellenőrzésnek vetik alá.