

Wilms3 sejtek | 300414

Általános információk

Description

A Wilms3 sejtvonalat egy gyermekbeteg primer Wilms-tumorából hozták létre, amelyet szomatikus WT1 mutáció jellemez. Sok más Wilms-tumor sejtvonaltól eltérően a Wilms3 heterozigóta frameshift mutációt tartalmaz a WT1 génben (c.1293-1294insA, p.V432SfsX87), ami egy csonka WT1 fehérje termelődéséhez vezet. A WT1 funkciójának ez a részleges elvesztése olyan tumorok kialakulásával jár, amelyek stromális vagy mesenchymális fenotípust mutatnak. A Wilms3-ban a WT1 mutáció azonban nem homozigóta, ami bonyolultabbá teszi a vizsgálatát, mivel megtartja a WT1 bizonyos funkcióját, amely a teljes WT1-vesztéssel rendelkező sejtvonalakhoz képest másképp befolyásolhatja a tumorbiológiát.

A Wilms3 a CTNNB1 génben is hordoz egy mutációt, amely kifejezetten a 41-es treonin (p.T41A), a Wnt jelátviteli útvonalban játszott kritikus szerepet érinti. Ez a mutáció stabilizálja a β -katenint, megakadályozva annak degradációját, és a Wnt-útvonal konstitutív aktiválódásához vezet. A Wnt jelátvitel tartós aktivációja hajtja a sejtek proliferációját és hozzájárul a tumorigenezishez a Wilms3-ban, ami kulcsfontosságú modellté teszi a CTNNB1 mutációk hatásának tanulmányozására egy részben funkcionális WT1 háttérrel összefüggésben.

Fenotípusosan a Wilms3 sejtek mesenchymális morfológiát mutatnak, vimentint expresszálnak, és hiányzik belőlük a citokeratin, ami összhangban van az eredeti tumorban megfigyelt stromális jellemzőkkel. Ezek a sejtek korlátozott differenciálódási potenciált mutatnak, és bizonyos körülmények között képesek némi mesenchymális differenciálódásra. A Wilms3 proteomikai elemzése számos receptor-tirozin-kináz (RTK), köztük a PDGFR β és az AXL aktiválódását mutatták ki, amelyek támogatják a sejtek túlélését és proliferációját. Emellett olyan downstream jelátviteli útvonalak, mint a MAPK és a PI3K/AKT aktiválódnak, ami erősíti a Wilms3 sejtek rosszindulatú tulajdonságait.

A Wilms3 egyik egyedülálló aspektusa a WT1 részleges funkcionalitása, ami külön perspektívát nyújt arra vonatkozóan, hogy a WT1 mutációk hogyan járulnak hozzá a Wilms-tumor biológiájához, amikor a mutáció nem teljes. A Wilms3-ban a WT1 és a Wnt jelátvitel közötti kölcsönhatás értékes lehetőséget kínál az ezen útvonalaknak a daganatok fejlődésében játszott árnyalt szerepének tanulmányozására. Összességében a Wilms3 fontos modellként szolgál a Wilms-tumor hátterében álló molekuláris mechanizmusok vizsgálatához a részleges WT1-vesztés és a konstitutív Wnt-útvonal aktiválódása esetén.

Organism Emberi

Tissue Vese

Disease Wilms-tumor

Applications In vitro sejt kultúra modell. Biokémiai vizsgálatok

Jellemzők

Age 11-12 hónap

Gender Férfi

Wilms3 sejtek | 300414**Ethnicity** Kaukázusi**Morphology** Orsó alakú**Cell type** Wilms sejtek**Growth properties** Adherent**Szabályozási adatok****Citation** Wilms3 (Cytion katalógusszám: 300414)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_A5SF**Biomolekuláris adatok****Mutational profile** WT1 mutációs státusz: homozigóta c.1293-1294insA, p.V432fsx87, LOH: 11p11-11pter, CTNNB1 mutációs státusz: vad típus**A kezelése****Culture Medium** MSCGM kit (a Lonzától)**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.

Wilms3 sejtek | 300414**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.

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 $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -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 krioüveget 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 sejtet 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 sejt-kölcsönhatás és növekedés elősegítése érdekében.
8. A sejtvonal folyamatos növekedése és fenntartása érdekében tartsa be a megállapított szubkultúra protokollokat, biztosítva a megbízható kísérleti eredményeket.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , párasított légkör.

Flask Coating

Nincs

Freezing Procedure

A kriokonzervált sejtvonalakat szárazjégen, validált, szigetelt csomagolásban szállítják, elegendő hűtőközeggel, hogy a szállítás során a hőmérsékletet körülbelül $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartsák. Átvételkor azonnal vizsgálja meg a tárolóedényt, és haladéktalanul helyezze át az injekciós üvegeket a megfelelő tárolóhelyre.

Wilms3 sejtek | 300414

Shipping Conditions

A kriokonzervált sejtvonalat 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.

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-kimutatási módszerekkel kizárják.

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

HLA allélok

A*: '03:01:01
B*: '35:01:01, '35:03:01
C*: '04:01:01
DRB1*: '04:03:01, '11:04:01
DQA1*: '03:01:01, '05:05:01
DQB1*: '03:01:01, '03:02:01
DPB1*: '01:01:01, '04:01:01
E: '01:03:02, '01:06:01