

Hep-70.4 sejtek | 400207

Általános információk

Description

A Hep-70.4 hepatóma sejtvonala egér májtumorból származik, kifejezetten a C57BL/6J egértörzsből. Ez a sejtvonala a p53 gén mutációiról nevezetes, amelyeket az in vitro szaporítás során különböző passzázsokban azonosítottak. A 8. passzáznál az egyszálú konformációs polimorfizmus (SSCP) analízis során gyenge kiegészítő jelet észleltek, ami p53 mutáció jelenlétére utal. A 38. passzázsáig két különböző p53 pontmutációt azonosítottak: egy G:C-ről C:G-re történő transzverziót a 135-ös kodonnál és egy C:G-ről G:C-re történő transzverziót az 5. exon 138-as kodonjánál. Ezek a mutációk aminosavváltásokat eredményeztek: alaninról prolinra, illetve ciszteinről triptofánra.

A Hep-70.4 sejtvonala morfológiai fenotípust mutat, amely szaporodása során jelentősen változik. Egyes alvonalak epiteliális morfológiát mutatnak, míg mások fibroblaszt-szerű megjelenést mutatnak. Ez a heterogenitás a sejtvonala összetett természetét és a különböző tenyésztési körülmények közötti alkalmazkodóképességét tükrözi. A normális és mutáns p53 allélok jelenléte a korai passzázsokban arra utal, hogy a mutációk szelektív növekedési előnyt biztosítanak, ami idővel a mutáns klónok túlsúlyához vezet.

A Hep-70.4 sejtvonala intermedier filamentum fehérjeanalízise kimutatta a normális májsejtekre jellemző K8 és K18 egyszerű keratinok, valamint a vimentin és a K19 keratin különböző mértékű expresszióját. Ezek a fehérjemintázatok megerősítik a sejtvonala hepatocita eredetét és hepatóma vonalnak való besorolását. A Hep-70.4 genomikai stabilitását DNS-ujjlenyomat-elemzéssel vizsgáltuk tovább, amely nem mutatott ki jelentős szerkezeti eltéréseket, bár a passzázs szám növekedésével egyes sávok relatív intenzitásának változásait figyeltük meg.

Organism	Egér
Tissue	Máj
Disease	Hepatocelluláris karcinóma
Synonyms	HEP-70.4, 70.4

Jellemzők

Breed/Subspecies	C57BL/6J
Age	Felnőtt
Gender	Női
Morphology	Epithelszerű
Growth properties	Adherent

Hep-70.4 sejtek | 400207

Szabályozási adatok

Citation	Hep-70.4 (Cytion katalógusszám: 400207)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	10090
CellosaurusAccession	CVCL_5772

Biomolekuláris adatok

Tumorigenic	Igen, C3H/He egerekben
Mutational profile	P53

A kezelése

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/L glükóz, w: 4 mM L-Glutamin, w: 3,7 g/L NaHCO ₃ , w: 1,0 mM nátrium-piruvát (Cytion cikkszám 820300a)
Supplements	A táptalajt egészítsük 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.
Seeding density	1×10^4 sejt/cm ²
Fluid renewal	3-5 naponta
Post-Thaw Recovery	Hagyja, hogy a sejtek legalább 24-48 órán keresztül regenerálódjanak.

Hep-70.4 sejtek | 400207

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 sejtszuszpenziót 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 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

A felolvasztás utáni optimális kötődés és életképesség érdekében **kollagénnel bevont lombikok vagy lemezek** használatát javasoljuk.

Hep-70.4 sejtek | 400207

Freezing Procedure

A kriokonzervált sejtvonalatokat 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.

Shipping Conditions

A kriokonzervált sejtvonalatokat 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.

Storage Conditions

Hosszú távú tartósítás céljából helyezze az üvegeket gőzfázisú folyékony nitrogénbe, körülbelül -150 és $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérsékleten. A $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -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.