

imWilms1 Sejtek | 300412

Általános információk

Description

A Wilms1 sejtvonal eredetileg egy primer Wilms-tumorból származik, amelyet egy olyan betegről nyertek, akinél nagy kétoldali vesedaganatot diagnosztizáltak, ami a Wilms-tumor (nefroblastoma) jellegzetes megjelenési formája. Ez a sejtvonal homozigóta nonszensz mutációt hordoz a WT1 génben (c.149 C>A, p.S50X), ami egy csonka, nem funkcionális WT1 fehérje termelődéséhez vezet. A WT1 kritikus gén a vese fejlődésében, és mutációja szorosan összefügg a Wilms-tumor patogenezisével, különösen a stromális differenciálódást mutató tumorokban. A Wilms1 sejtek stabil kariotípust mutatnak jelentős kromoszóma-rendellenességek nélkül, és mesenchymális fenotípus jellemzi őket, vimentint expresszálnak, miközben hiányoznak belőlük az olyan epithelialis markerek, mint a citokeratin. A vonal korlátozott, de jelentős mesenchymális differenciálódási képességet mutat, beleértve az izomszerű sejtekké való differenciálódás lehetőségét is bizonyos körülmények között, ami kulcsfontosságú modellt teszi a WT1 mutációk molekuláris következményeinek tanulmányozásához.

Az elsődleges Wilms1 sejtek korlátozott élettartamának leküzdése érdekében az imWilms1 sejtvonalat úgy hoztuk létre, hogy az eredeti tumorsejtekbe egy háromszorosan mutáns SV40 nagy T antigént (U19dl89-97tsA58) vittünk be, ami megkönnyíti az immortalizációjukat. Ez a módosítás lehetővé teszi, hogy az imWilms1 sejtek korlátlanul szaporodjanak, miközben megőrzik a kromoszóma-stabilitást, így megbízható modellt kínálnak hosszú távú vizsgálatokhoz. Az immortalizált imWilms1 sejtek továbbra is ugyanazt a WT1 mutációt mutatják, és megtartják a szülő Wilms1 vonal mesenchymális jellemzőit.

Genetikai és fenotípusos jellemzői mellett az imWilms1 sejtvonalat kiterjedten elemezték jelátviteli útvonalaktivitása szempontjából. A proteomikai vizsgálatok számos receptor-tirozin-kináz (RTK), köztük az EGFR, a PDGFR β és az AXL foszforilációját és aktiválódását mutatták ki, a MAPK jelátviteli útvonalak downstream aktiválódásával. Ezen útvonalak következetes aktiválása az imWilms1 sejtekben aláhúzza jelentőségüket a Wilms-tumor célzott terápiás stratégiáinak feltárása szempontjából. Összességében az imWilms1 egy robusztus és hosszú távú modelltként szolgál a Wilms-tumor kialakulásának és progressziójának hátterében álló molekuláris mechanizmusok vizsgálatára, különösen a WT1 mutációk és aberráns jelátviteli útvonalak által vezéreltek esetében.

Organism Emberi

Tissue Vese

Disease Wilms tumor

Synonyms IM-WT-1

Jellemzők

Age 10 hónap

Gender Női

Ethnicity Kaukázusi

imWilms1 Sejtek | 300412

Morphology Orsó alakú

Cell type Wilms sejtek

Growth properties Adherent

Szabályozási adatok

Citation imWilms1 (Cytion katalógusszám 300412)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

CellosaurusAccession CVCL_A5SN

GMO Status GMO-S1: Ez az imWilms1 humán Wilms-tumor vonal egy háromszorosan mutáns SV40 T-antigén kazettát tartalmaz, amely lehetővé teszi a feltételes immortalizációt a nefroblastoma kutatásához. Ez a besorolás csak Németországban érvényes, máshol ettől eltérhet.

Biomolekuláris adatok

Mutational profile WT1 mutációs státusz: homozigóta c. 149 C>A, p.S50x, LOH: 11p11-11pter, CTNNB1 mutációs státusz: heterozigóta TCT>TTT, p.S45F

A kezelése

Culture Medium MSCGM kit (a Lonztól)

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 percre hagyjuk szobahőmérsékleten inkubálni, hogy leváljanak. Az inkubálás után óvatosan keverjük össze a sejteket 10 ml tápfolyadékkal, hogy reszuszpendáljuk őket, majd centrifugáljuk 300xg-nél 3 percre. Dobja el a felülúszót, szuszpendálja újra a sejteket friss tápfolyadékban, és helyezze át őket új lombikokba, amelyek már friss tápfolyadékot tartalmaznak.

imWilms1 Sejtek | 300412

Fluid renewal hetente 1-2 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.

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 krioümlékét 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.

imWilms1 Sejtek | 300412

Freezing Procedure

A kriokonzervált sejtvonalakat 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 sejtvonalakat 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 sejtkultúrákat napi vizuális ellenőrzésnek vetik alá.

HLA allélok

A*: '03:01:01, '24:02:01
B*: '35:03:01, '38:01:01
C*: '12:03:01
DRB1*: '07:01:01, '14:54:01
DQA1*: '01:04:01, '02:01:01
DQB1*: '02:02:01, '05:03:01
DPB1*: '02:01:02G, '04:02:01G
E: '01:03:01, '01:03:02