

Sel NCI-H1299-RFP | 300272

Informasi umum

Description

Sel RFP NCI-H1299, yang dimodifikasi untuk menyertakan reporter dalam gen DAPK1, tidak hanya berguna untuk mempelajari aktivasi gen tertentu, tetapi juga memberikan pemahaman yang lebih luas tentang bagaimana sel bereaksi terhadap obat epigenetik secara global. Dengan menggunakan teknik yang disebut Cap Analysis of Gene Expression (CAGE), para peneliti dapat merinci perubahan di mana transkripsi dimulai di seluruh genom sebagai respons terhadap pengobatan dengan DNMTi (DAC), HDACi (SAHA atau SB939), atau kombinasinya. Metode ini mengungkapkan tidak hanya reaktivasi gen DAPK1 yang diharapkan tetapi juga munculnya situs awal transkripsi baru, yang disebut TSSs non-anotasi yang diinduksi pengobatan (TINATs), terutama di bawah perawatan obat. Situs awal baru ini biasanya terletak di daerah genom yang biasanya tidak menghasilkan protein dan mengarah pada pembuatan molekul RNA baru yang berpotensi mengkode protein.

Analisis lebih lanjut menunjukkan bahwa molekul RNA baru ini kadang-kadang dapat bergabung dengan yang sudah ada untuk membentuk apa yang dikenal sebagai transkrip fusi TINAT-exon. Tergantung pada bagaimana transkrip ini disambung, transkrip ini dapat diterjemahkan menjadi protein baru yang tidak lazim. Proses ini telah dikonfirmasi melalui teknik laboratorium yang menunjukkan bahwa transkrip ini memang dapat menghasilkan bentuk protein baru. Protein-protein ini mungkin berinteraksi secara tidak normal di dalam sel atau dikenali sebagai benda asing oleh sistem kekebalan tubuh, sehingga berpotensi menawarkan target baru untuk terapi kanker.

Aktivasi TINAT ini melibatkan perubahan rumit dalam metilasi DNA dan modifikasi histon, yang menggambarkan interaksi yang kompleks antara faktor-faktor epigenetik ini dalam pengobatan. Secara khusus, penggunaan gabungan DAC dan SB939 menunjukkan efek yang lebih besar, meningkatkan ekspresi transkrip baru ini lebih banyak daripada ketika salah satu obat digunakan sendiri. Memahami interaksi ini dan hasilnya membantu memperjelas bagaimana terapi epigenetik mengubah perilaku sel dan membuka kemungkinan untuk pengobatan kanker baru yang memanfaatkan perubahan molekuler yang kompleks ini.

Organism

Manusia

Tissue

Paru-paru

Disease

Karsinoma sel besar

Metastatic site

Lokasi tumor primer (paru-paru)

Applications

Penelitian terapi epigenetik; reaktivasi gen DAPK1; studi respons terhadap obat DNMTi dan HDACi; TSS yang tidak teranotasi akibat pengobatan (TINAT); transkriptomik CAGE; analisis transkrip fusi; produksi protein atipikal dari promotor tersembunyi; penyaringan kombinasi obat epigenetik

Karakteristik

Morphology

Seperti epitel

Cell type

Sel epitel

Sel NCI-H1299-RFP | 300272

Growth properties	Patuh
--------------------------	-------

Data Peraturan

Citation	NCI-H1299-EGFP, dengan resistensi G418 dan reporter yang dinonaktifkan (DKFZ # P-1045) (nomor katalog Cytion 300272)
-----------------	--

Biosafety level	1
------------------------	---

NCBI_TaxID	9606
-------------------	------

CellosaurusAccession	CVCL_XB25
-----------------------------	-----------

GMO Status	GMO-S1: Turunan NCI-H1299 ini (DKFZ #P-1045) mengandung reporter EGFP yang dinonaktifkan secara stabil di lokus DAPK1, sehingga memungkinkan pembacaan reaktivasi epigenetik. Terdapat kaset resistensi G418. Klasifikasi ini hanya berlaku di Jerman dan mungkin berbeda di negara lain.
-------------------	---

Data Biomolekuler

Penanganan

Culture Medium	RPMI 1640, w: 2,0 mM Glutamin stabil, w: 2,0 g/L NaHCO ₃ (Nomor artikel Cytion 820700a)
-----------------------	--

Supplements	Tambahkan media dengan 10% FBS
--------------------	--------------------------------

Dissociation Reagent	Accutase
-----------------------------	----------

Doubling time	sekitar 24 hingga 36 jam
----------------------	--------------------------

Subculturing	Buang media lama dari sel yang melekat dan cuci dengan PBS yang tidak mengandung kalsium dan magnesium. Untuk labu T25, gunakan 3-5 ml PBS, dan untuk labu T75, gunakan 5-10 ml. Kemudian, tutupi sel sepenuhnya dengan Accutase, menggunakan 1-2 ml untuk labu T25 dan 2,5 ml untuk labu T75. Biarkan sel diinkubasi pada suhu kamar selama 8-10 menit untuk melepaskannya. Setelah inkubasi, campurkan sel secara perlahan dengan 10 ml medium untuk meresuspensi sel, kemudian sentrifugasi pada 300xg selama 3 menit. Buang supernatan, resuspensi sel dalam medium segar, dan pindahkan ke dalam labu baru yang sudah berisi medium segar.
---------------------	---

Split ratio	1 sampai 5
--------------------	------------

Sel NCI-H1299-RFP | 300272

Seeding density 1 hingga 3×10^4 sel/cm²

Fluid renewal 2 hingga 3 kali per minggu

Freeze medium Sebagai media kriopreservasi, kami menggunakan media pertumbuhan lengkap (termasuk FBS) + 10% DMSO untuk viabilitas pasca-pencairan yang memadai, atau CM-1 (nomor katalog Cytion 800100), yang mencakup osmoprotektan yang dioptimalkan dan penstabil metabolisme untuk meningkatkan pemulihan dan mengurangi stres yang diinduksi kriopreservasi.

Thawing and Culturing Cells

1. Pastikan botol tetap dalam keadaan beku pada saat pengiriman, karena sel dikirim dengan es kering untuk mempertahankan suhu optimal selama perjalanan.
2. Setelah diterima, segera simpan cryovial pada suhu di bawah -150°C untuk memastikan pelestarian integritas sel, atau lanjutkan ke langkah 3 jika kultur segera diperlukan.
3. Untuk kultur segera, segera cairkan botol dengan merendamnya dalam penangas air bersuhu 37°C dengan air bersih dan agen antimikroba, aduk perlahan selama 40-60 detik hingga gumpalan es kecil tetap ada.
4. Lakukan semua langkah selanjutnya dalam kondisi steril di dalam tudung alir, desinfektan kriovial dengan etanol 70% sebelum dibuka.
5. Buka botol yang telah didesinfeksi dengan hati-hati dan pindahkan suspensi sel ke dalam tabung sentrifugasi 15 ml yang berisi 8 ml media kultur suhu kamar, aduk perlahan.
6. Sentrifus campuran pada 300 x g selama 3 menit untuk memisahkan sel dan dengan hati-hati membuang supernatan yang mengandung sisa media pembekuan.
7. Resuspensi pelet sel dengan hati-hati dalam 10 ml medium kultur segar. Untuk sel yang melekat, bagi suspensi di antara dua labu kultur T25; untuk kultur suspensi, pindahkan semua media ke dalam satu labu T25 untuk mendorong interaksi dan pertumbuhan sel yang efektif.
8. Patuhi protokol subkultur yang telah ditetapkan untuk pertumbuhan dan pemeliharaan garis sel yang berkelanjutan, memastikan hasil eksperimental yang andal.

Incubation Atmosphere 37°C, 5% CO₂, atmosfer yang dilembabkan.

Flask Coating Tidak ada

Sel NCI-H1299-RFP | 300272

Freezing Procedure

Lini sel kriopreservasi dikirim di atas es kering dalam kemasan terisolasi yang divalidasi dengan refrigeran yang cukup untuk mempertahankan suhu sekitar -78°C selama perjalanan. Setelah diterima, segera periksa wadah dan pindahkan botol tanpa penundaan ke tempat penyimpanan yang sesuai.

Shipping Conditions

Lini sel kriopreservasi dikirim di atas es kering dalam kemasan terisolasi yang divalidasi dengan refrigeran yang cukup untuk mempertahankan suhu sekitar -78°C selama perjalanan. Setelah diterima, segera periksa wadah dan pindahkan botol tanpa penundaan ke tempat penyimpanan yang sesuai.

Storage Conditions

Untuk pengawetan jangka panjang, tempatkan botol dalam nitrogen cair fase uap pada suhu sekitar -150 hingga -196°C . Penyimpanan pada suhu -80°C hanya dapat diterima sebagai langkah sementara sebelum dipindahkan ke nitrogen cair.

Pengendalian Mutu & Analisis Molekuler

Sterility

Kontaminasi mikoplasma disingkirkan dengan menggunakan tes berbasis PCR dan metode deteksi mikoplasma berbasis pendaran.

Untuk memastikan tidak ada kontaminasi bakteri, jamur, atau ragi, kultur sel menjalani inspeksi visual setiap hari.