

Cellule HaCaT-ras II-4 | 300495**Informazioni generali****Description**

Le cellule HaCaT-ras II-4 sono un modello cellulare notevole e ampiamente studiato nella scienza biologica. Queste cellule derivano da cheratinociti cutanei umani immortalizzati spontaneamente, noti come cellule HaCaT, modificati mediante trasfezione con l'oncogene c-Ha-ras (EJ). La selezione di queste cellule si è basata sulla loro resistenza al G418, un antibiotico selettivo, come descritto nello studio completo condotto da Boukamp et al. nel 1990.

Una caratteristica notevole delle cellule HaCaT-ras II-4 è la loro natura tumorigenica. Quando queste cellule clonali vengono iniettate in topi Balb/c-nu/nu, mostrano un comportamento affascinante, formando carcinomi a cellule squamose altamente differenziati e localmente invasivi. Questa proprietà unica permette ai ricercatori di esplorare i meccanismi di sviluppo e progressione del tumore in un ambiente sperimentale controllato.

Le cellule HaCaT-ras II-4 derivano prevalentemente dalla popolazione caucasica, garantendo la rilevanza di uno specifico gruppo etnico nelle indagini scientifiche. La loro origine e le loro caratteristiche le rendono una risorsa preziosa per i ricercatori interessati a studiare vari aspetti della biologia e del differenziamento della pelle.

Queste cellule possiedono un fenotipo da parzialmente a completamente differenziato in condizioni di coltura tipiche. Questo fenotipo è attribuito all'abbondante presenza di calcio sia nei terreni di coltura tradizionali che nel siero fetale bovino, che fornisce un ambiente ideale per le cellule che mostrano caratteristiche simili a quelle delle cellule cutanee mature. Questa caratteristica consente ai ricercatori di studiare gli intricati processi coinvolti nello sviluppo della pelle, nella guarigione delle ferite e nella differenziazione epidermica.

Grazie alla loro natura tumorigenica e alla capacità di replicare la biologia della pelle in vitro, le cellule HaCaT-ras II-4 offrono un'opportunità unica di esplorare le vie molecolari associate al cancro della pelle e ad altri disturbi correlati. Utilizzando questo eccezionale modello cellulare, i ricercatori possono approfondire i meccanismi alla base della tumorigenesi, del potenziale invasivo e degli interventi terapeutici.

Le cellule HaCaT-ras II-4 sono uno strumento fondamentale per la ricerca biologica, in particolare per gli studi di biologia della pelle e di differenziazione. La loro origine da cheratinociti cutanei umani immortalizzati spontaneamente, la modificazione con l'oncogene c-Ha-ras (EJ) e il successivo comportamento tumorigenico nei topi le rendono preziose per lo studio delle malattie della pelle e degli approcci terapeutici. Sfruttando le caratteristiche uniche delle cellule HaCaT-ras II-4, i ricercatori possono approfondire la conoscenza della biologia della pelle e contribuire a far progredire le conoscenze mediche e le opzioni terapeutiche per diverse patologie cutanee.

Organism Umano**Tissue** La pelle**Synonyms** HaCaT-ras clone II-4, HaCaT II-4, II-4**Caratteristiche****Age** 62 anni**Gender** Uomo

Cellule HaCaT-ras II-4 | 300495**Ethnicity** Caucasico**Cell type** Cheratinocita**Growth properties** Aderente**Dati normativi****Citation** HaCaT-ras II-4 (catalogo Cytion numero 300495)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_3868**Depositor** DKFZ, Heidelberg**GMO Status** GMO-S1: questa linea di cheratinociti umani (HaCaT-ras II-4) contiene un plasmide che codifica sequenze dell'oncogene c-Ha-Ras introdotte mediante trasfezione, consentendo un comportamento di crescita trasformato. Il costrutto è integrato in cheratinociti derivati da HaCaT. Questa classificazione si applica solo in Germania e può differire altrove.**Dati biomolecolari****Protein expression** P53 (+), CEA (+),**Tumorigenic** Formazione di un carcinoma a cellule squamose altamente differenziato e localmente invasivo in topi Balb/c-nu/nu.**Karyotype** Aneuploide (ipotetraploide)**Manipolazione****Culture Medium** DMEM, w: 4,5 g/L di glucosio, w: 4 mM di L-Glutamina, w: 3,7 g/L di NaHCO₃, w: 1,0 mM di piruvato di sodio (articolo Cytion numero 820300a)**Supplements** Integrare il terreno di coltura con il 10% di FBS

Cellule HaCaT-ras II-4 | 300495

Dissociation Reagent

La miscela 1:1 di EDTA (stock: 0,05%) e tripsina (stock: 0,1%) deve essere preparata ogni volta prima del distacco delle cellule usando PBS senza Ca²⁺ e Mg²⁺ per fornire un'osmolarità fisiologica. Si sconsiglia di utilizzare miscele pronte all'uso di tripsina/EDTA, che potrebbero causare la formazione di grumi di cellule. In alternativa, è possibile utilizzare TrypLETM Express (Life Technologies) al posto di tripsina/EDTA. Seguire il protocollo del produttore.

Subculturing

1. **Eliminare il terreno vecchio:** Rimuovere il vecchio terreno dalle fiasche.
2. **Lavare le cellule:** Aggiungere 3-5 ml di PBS (senza calcio e magnesio) alle fiasche T25 o 5-10 ml alle fiasche T75 per lavare le cellule aderenti.
3. **Aggiungere la soluzione di EDTA:** Ricoprire completamente lo strato cellulare con una soluzione di EDTA allo 0,05% preparata di fresco: utilizzare 1-2 ml per le fiasche T25 e 2,5 ml per le fiasche T75.
4. **Incubazione:** Incubare le fiasche a 37 gradi Celsius per 10 minuti.
5. **Aggiungere la soluzione di tripsina/EDTA:** Dopo l'incubazione, aggiungere una soluzione di tripsina/EDTA appena preparata (0,05% di tripsina, 0,025% di EDTA) alle fiasche, assicurandosi che le cellule siano completamente coperte; utilizzare 1 ml per le fiasche T25 e 2,5 ml per le fiasche T75.
6. **Monitorare il distacco:** Osservare le cellule, che dovrebbero staccarsi entro 1-2 minuti.
7. **Neutralizzare la tripsina:** Aggiungere terreno di coltura cellulare contenente FBS per bloccare l'attività della tripsina.
8. **Trasferire le cellule:** Distribuire la sospensione cellulare in nuove fiasche riempite con terreno di coltura fresco.

Split ratio

Si consiglia un rapporto da 1:5 a 1:10

Seeding density

1×10^4 cellule/cm²

Fluid renewal

2 volte a settimana

Freeze medium

Come terreno di crioconservazione, utilizziamo un terreno di crescita completo (incluso FBS) + 10% DMSO per un'adeguata vitalità post-scongelo, o CM-1 (numero di catalogo Cytion 800100), che include osmoprotettori e stabilizzatori metabolici ottimizzati per migliorare il recupero e ridurre lo stress crio-indotto.

Cellule HaCaT-ras II-4 | 300495

Thawing and Culturing Cells

1. Verificare che la fiala rimanga profondamente congelata al momento della consegna, poiché le cellule vengono spedite con ghiaccio secco per mantenere le temperature ottimali durante il trasporto.
2. Al ricevimento, conservare immediatamente la criovial a temperature inferiori a -150°C per garantire la conservazione dell'integrità cellulare, oppure procedere al punto 3 se è necessaria una coltura immediata.
3. Per la coltura immediata, scongelare rapidamente la fiala immergendola in un bagno d'acqua a 37°C con acqua pulita e un agente antimicrobico, agitando delicatamente per 40-60 secondi finché non rimane un piccolo grumo di ghiaccio.
4. Eseguire tutte le fasi successive in condizioni di sterilità in una cappa a flusso, disinfettando la criovial con etanolo al 70% prima dell'apertura.
5. Aprire con cautela la fiala disinfettata e trasferire la sospensione cellulare in una provetta da centrifuga da 15 ml contenente 8 ml di terreno di coltura a temperatura ambiente, mescolando delicatamente.
6. Centrifugare la miscela a 300 x g per 3 minuti per separare le cellule e scartare con cura il surnatante contenente il terreno di coltura residuo.
7. Risospendere delicatamente il pellet cellulare in 10 ml di terreno di coltura fresco. Per le cellule aderenti, dividere la sospensione tra due fiasche di coltura T25; per le colture in sospensione, trasferire tutto il terreno in una fiasca T25 per promuovere l'interazione e la crescita delle cellule.
8. Attenersi ai protocolli di subcoltura stabiliti per la crescita e il mantenimento continui della linea cellulare, garantendo risultati sperimentali affidabili.

Incubation Atmosphere

37°C, 5% CO₂, atmosfera umidificata.

Flask Coating

Nessuno

Freezing Procedure

Le linee cellulari crioconservate vengono spedite su ghiaccio secco in confezioni isolate e convalidate, con una quantità di refrigerante sufficiente a mantenere circa -78 °C durante il trasporto. Al ricevimento, ispezionare immediatamente il contenitore e trasferire immediatamente le fiale in un luogo di conservazione appropriato.

Shipping Conditions

Le linee cellulari crioconservate vengono spedite su ghiaccio secco in confezioni isolate e convalidate, con una quantità di refrigerante sufficiente a mantenere circa -78 °C durante il trasporto. Al ricevimento, ispezionare immediatamente il contenitore e trasferire immediatamente le fiale in un luogo di conservazione appropriato.

Cellule HaCaT-ras II-4 | 300495

Storage Conditions

Per la conservazione a lungo termine, porre le fiale in azoto liquido in fase vapore a una temperatura compresa tra -150 e -196 °C circa. La conservazione a -80 °C è accettabile solo come breve fase intermedia prima del trasferimento in azoto liquido.

Controllo di qualità / Profilo genetico / HLA

Sterility

La contaminazione da micoplasma viene esclusa utilizzando sia saggi basati sulla PCR sia metodi di rilevamento del micoplasma basati sulla luminescenza.

Per garantire l'assenza di contaminazione batterica, fungina o da lieviti, le colture cellulari sono sottoposte a ispezioni visive quotidiane.

Profilo STR

Amelogenin: x,x
CSF1PO: 9,11
D13S317: 10,12
D16S539: 9,12
D5S818: 12
D7S820: 9,11
TH01: 9.3
TPOX: 11,12
vWA: 16,17
D3S1358: 16
D21S11: 28,30.2
D18S51: 12
Penta E: 7,12
Penta D: 11,13
D8S1179: 14
FGA: 24