

"ImWilms10T" elementai | 300419**Bendra informacija****Description**

"imWilms10T" ląstelių linija yra imortalizuotas pirminės Wilms10T naviko ląstelių linijos variantas, gautas iš Wilms naviko (nefroblastomos) mėginio, paimto iš pediatriinio paciento. Ši ląstelių linija išsiskiria homozigotine WT1 geno delecija, dėl kurios visiškai prarandama WT1 baltymo funkcija. WT1 yra labai svarbus genas inkstų vystymuisi, o jo ištrynimasis imWilms10T linijoje atspindi sunkų genetinį sutrikimą, susijusį su Vilms naviko patogenezė. Be WT1 delecijos, imWilms10T ląstelėms būdingas heterozigotiškumo praradimas (LOH) 11p15 chromosomų srityje, kurioje yra svarbiausi genai, pavyzdžiui, IGF2, o tai lemia agresyvią naviko elgseną.

Siekiant įveikti ribotą Wilms10T ląstelių gyvavimo trukmę, imWilms10T ląstelių linija buvo sukurta į originalias naviko ląsteles įvedus trigubai mutavusį SV40 didelį T antigeną (U19dl89-97tsA58). Šis imortalizacijos procesas leidžia imWilms10T ląstelėms daugintis neribotą laiką, išlaikant chromosomų stabilumą, todėl jos tampa patikimu ilgalaikių tyrimų modeliu. ImWilms10T ląstelės išlaiko svarbiausias tėvinės Wilms10T linijos savybes, įskaitant visišką WT1 praradimą ir LOH 11p15 vietoje, todėl jos yra neįkainojamas šaltinis tiriant molekulinę WT1 pašalinimo pasekmes ir su tuo susijusius navikinius procesus.

imWilms10T ląstelės buvo išsamiai tiriamos dėl jų dalyvavimo pagrindiniuose signaliniuose keliuose, skatinančiuose naviko progresavimą. Proteominės analizės atskleidė, kad šiose ląstelėse fosforilinama ir aktyvuojama keletas receptorių tirozino kinazių (RTK), tokių kaip IGF1R, PDGFRβ ir AXL. Šie aktyvuoti receptoriai siunčia signalus per tolesnius kelius, įskaitant MAPK ir PI3K/AKT kelius, kurie yra labai svarbūs piktybiniam ląstelių fenotipui palaikyti. Ląstelių linija imWilms10T yra svarbus įrankis tiriant visiško WT1 praradimo įtaką ląstelių signalizacijai, naviko augimui ir galimiems Vilms naviko, ypač agresyvesnių naviko potipių, terapiniams taikiniams.

Organism Žmogus**Tissue** Inkstai**Disease** Vilms navikas**Synonyms** "ImWilms10 T", IM-WT-10**Charakteristikos****Age** 2 metai**Gender** Moteris**Ethnicity** Kaukaziečių**Morphology** Verpstės formos**Cell type** Vilms ląstelės

"ImWilms10T" elementai | 300419

Growth properties Prigludęs

Reguliavimo duomenys

Citation "ImWilms10T" ("Cytion" katalogo numeris 300419)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

CellosaurusAccession CVCL_DF34

GMO Status GMO-S1: šiame imWilms10T darinyje yra tas pats trigubai mutavęs SV40 T-antigenas, leidžiantis sąlyginį imortalizavimą vaikų inkstų navikų biologijai. Ši klasifikacija taikoma tik Vokietijoje ir gali skirtis kitose šalyse.

Biomolekuliniai duomenys

Mutational profile WT1 mutacijos statusas: homozigotinis del WT1 del11p13, LOH: nėra 11p13, bet UPD 11p15, CTNNB1 mutacijos statusas: homozigotinis del TCT, p.DS45, UPD 3p

Tvarkymas

Culture Medium MSCGM rinkinys (iš "Lonza")

Dissociation Reagent Accutase

Subculturing Pašalinkite seną terpę nuo prilipusių ląstelių ir nuplaukite jas PBS, kuriame nėra kalcio ir magnio. T25 kolboms naudokite 3-5 ml PBS, o T75 kolboms - 5-10 ml. Tuomet visiškai užpilkite ląsteles "Accutase", naudodami 1-2 ml T25 kolboms ir 2,5 ml T75 kolboms. Leiskite ląstelėms inkubuotis kambario temperatūroje 8-10 minučių, kad jos atsiskirtų. Po inkubacijos atsargiai sumaišykite ląsteles su 10 ml terpės, kad jos vėl suspenduotų, tada 3 minutes centrifuguokite 300xg greičiu. Išmeskite supernatantą, vėl sutirpinkite ląsteles šviežioje terpėje ir perkeltite jas į naujas kolbas, kuriose jau yra šviežia terpė.

Fluid renewal 1-2 kartus per savaitę

Freeze medium Kaip kriokonservavimo terpę naudojame visišką augimo terpę (įskaitant FBS) + 10 % DMSO, kad būtų užtikrintas tinkamas gyvybingumas po atšildymo, arba CM-1 (Cytion katalogo numeris 800100), kurioje yra optimizuotų osmoprotektorių ir medžiagų apykaitos stabilizatorių, kad būtų pagerintas atsigavimas ir sumažintas kriokonservavimo sukeltas stresas.

"ImWilms10T" elementai | 300419

Thawing and Culturing Cells

1. Patikrinkite, ar pristatant buteliuką jis išlieka gerai užšaldytas, nes ląstelės gabenamos ant sauso ledo, kad gabenimo metu būtų palaikoma optimali temperatūra.
2. Gavę iš karto laikykite kriovialą žemesnėje nei $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, kad užtikrintumėte ląstelių vientisumo išsaugojimą, arba pereikite prie 3 veiksmo, jei reikia nedelsiant kultivuoti.
3. Jei norite nedelsiant pradėti kultivuoti, greitai atšildykite buteliuką panardindami jį į $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūros vandens vonelę su švariu vandeniu ir antimikrobine priemone, švelniai maišydami 40-60 sekundžių, kol liks nedidelis ledo gabalėlis.
4. Visus tolesnius veiksmus atlikite steriliomis sąlygomis srauto gaubte, prieš atidarydami kriovialą dezinfekuokite jį 70 % etanoliu.
5. Atsargiai atidarykite dezinfekuotą buteliuką ir perpilkite ląstelių suspensiją į 15 ml centrifugos mėgintuvėlį, kuriame yra 8 ml kambario temperatūros mitybinės terpės, atsargiai išmaišykite.
6. Mišinį centrifuguokite 300 x g greičiu 3 minutes, kad atsiskirtų ląstelės, ir atsargiai išmeskite supernatantą su šaldymo terpės likučiais.
7. Švelniai resuspenduokite ląstelių granules 10 ml šviežios mitybinės terpės. Jei ląstelės yra prigludusios, suspensiją padalykite į dvi T25 kolbas; jei tai suspensinės kultūros, visą terpę perkelti į vieną T25 kolbą, kad paskatintumėte veiksmingą ląstelių sąveiką ir augimą.
8. Laikykitės nustatytų subkultūrų protokolų, kad ląstelių linija nuolat augtų ir būtų palaikoma, taip užtikrinant patikimus eksperimentų rezultatus.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , drėkintoje atmosferoje.

Flask Coating

Nėra

Freezing Procedure

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelti mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

Shipping Conditions

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelti mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

"ImWilms10T" elementai | 300419

Storage Conditions

Norėdami ilgai saugoti, įdėkite buteliukus į garų fazės skystą azotą maždaug -150-196 °C temperatūroje. Laikymas -80 °C temperatūroje yra priimtinas tik kaip trumpas tarpinis etapas prieš perkeliant į skystą azotą.

Kokybės kontrolė / Genetinis profilis / HLA

Sterility

Mikoplazmos užterštumas atmetamas taikant PGR pagrįstus tyrimus ir liuminescencinius mikoplazmos aptikimo metodus.

Siekiant užtikrinti, kad nebūtų užteršimo bakterijomis, grybeliais ar mielėmis, ląstelių kultūros kasdien vizualiai tikrinamos.

HLA aleliai

A*: '01:01:01, '11:01:01
B*: '18:01:01, '27:05:02
C*: '01:02:01, '12:03:01
DRB1*: '01:01:01, '11:04:01
DQA1*: '01:01:01, '05:05:01
DQB1*: '03:01:01, '05:01:01
DPB1*: '04:01:01G, '04:02:01G
E: '01:01:01