

HaCaT-ras A5 ląstelės | 300494

Bendra informacija

Description

HaCaT-ras A5 ląstelės yra spontaniškai imortalizuota, netumorigeninė žmogaus odos keratinocitų ląstelių linija, naudojama tiriant naviko mikroaplinkos sąveiką ir odos karcinomos progresavimą. Šios ląstelės, gautos iš 62 metų kaukaziečio, patyrė kloninę atranką ir mutagenę, o tai kartu su autokrininiu augimo veiksnių reguliavimu leidžia formuoti lėtai augančius, labai diferencijuotus gerybinius cistinius navikus Balb/c-nu/nu pelėms. Dėl to jos yra vertingas modelis tiriant ląstelių dinamiką ir molekulinis navikų progresavimo in vivo mechanizmus.

HaCaT-ras A5 ląstelės ypač naudingos siekiant išsiaiškinti sudėtingą naviko ląstelių ir aplinkinių stromos ląstelių, įskaitant fibroblastus, imunines ląsteles ir endotelio ląsteles, sąveiką. Šias sąveikas lemia įvairių signalinių molekulių, tokių kaip augimo veiksniai, citokinai ir proteazės, iš kurių svarbiausias vaidmuo tenka interleukinui-6 (IL-6), sekrecija. Yra žinoma, kad IL-6 reguliacija sutrinka daugelio tipų vėžio atveju, visų pirma dėl pernelyg didelės STAT3 transkripcijos faktoriaus ekspresijos arba nuolatinio jo aktyvavimo.

Tyrimai parodė, kad IL-6 stimuliuojant HaCaT-ras A5 ląsteles labai padidėja jų proliferacija per JAK/STAT signalinį kelią, o fibroblastai lieka nepaveikti dėl stipresnio SOCS3, neigiamo šio kelio reguliatoriaus, slopinimo. Šis skirtingas atsakas buvo užfiksuotas matematiname modelyje, aprašančiame STAT3 ir SOCS3 dinamiką, leidžiančiame geriau suprasti ląstelėms būdingas signalines kaskadas.

Be to, IL-6 ne tik tiesiogiai veikia HaCaT-ras A5 ląstelių proliferaciją, bet ir netiesiogiai veikia ląstelės aplinką aktyvindamas augimo veiksnių, tokių kaip HGF, KGF, VEGF ir IL-8, tinklą. Genų raiškos analizė, apimanti daugiau kaip 16 000 genų, parodė, kad IL-6 stimuliavimas padidina 19 genų, susijusių su interferono signalo keliu tiek HaCaT-ras A5 ląstelėse, tiek fibroblastuose, o tai koreliuoja su pastebėtu augimo slopinimu fibroblastuose.

SerpinB4 lemiamo vaidmens HaCaT-ras A5 ląstelių proliferacijai atradimas, patvirtintas siRNA nukabinimu, pabrėžia sudėtingą IL-6 reguliavimą tiek naviko, tiek stromos ląstelėse. Toks išsamus IL-6 vaidmens supratimas padidina galimybes kurti tikslines terapines strategijas, skirtas IL-6 signaliniams keliams naviko mikroaplinkoje moduluoti.

Apskritai HaCaT-ras A5 ląstelės yra patikimas modelis sudėtingai naviko mikroaplinkos sąveikai tirti, atveriantis kelią naujiems požiūriams į vėžio tyrimus ir terapijos kūrimą.

Organism Žmogus

Tissue Odos

Synonyms HaCaT-ras klonas A-5, HaCaT A-5, A-5, A5

Charakteristikos

Age 62 metai

Gender Vyras

Ethnicity Kaukaziečių

HaCaT-ras A5 ląstelės | 300494**Cell type** Keratinocitai**Growth properties** Prigludęs**Reguliavimo duomenys****Citation** HaCaT-ras A5 (Cytion katalogo numeris 300494)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_xK16**GMO Status** GMO-S1: Šioje HaCaT-ras A5 linijoje yra plazmidinis c-Ha-ras onkogeno konstruktas, skirtas epitelio transformacijos tyrimams. Ši klasifikacija taikoma tik Vokietijoje ir gali skirtis kitose šalyse.**Biomolekuliniai duomenys****Protein expression** P53 (+), CEA (+),**Tumorigenic** Balb/c-nu/nu pelių gerybinių navikų formavimasis.**Karyotype** Aneuploidiniai (hipotetraploidiniai)**Tvarkymas****Culture Medium** DMEM, š: 4,5 g/l gliukozės, š: 4 mM L-glutamino, š: 3,7 g/l NaHCO₃, š: 1,0 mM natrio piruvato (Cytion gaminio numeris 820300a)**Supplements** Papildykite terpę 10 % FBS**Dissociation Reagent** EDTA (0,05 % atsargų) ir tripsino (0,1 % atsargų) mišinys 1:1 turi būti ruošiamas kiekvieną kartą prieš atskiriant ląsteles, naudojant PBS be Ca²⁺ ir Mg²⁺, kad būtų užtikrintas fiziologinis osmoliariškumas. Nerekomenduojama naudoti paruoštų tripsino ir EDTA mišinių, nes gali susidaryti ląstelių gumulėlių. Vietoj tripso ir EDTA galima naudoti "TrypLETM Express" ("Life Technologies"). Reikėtų laikytis gamintojo protokolo.

HaCaT-ras A5 ląstelės | 300494

Subculturing

1. **Išmeskite seną terpę:** Iš kolbų išimkite seną terpę.
2. **Išplaukite ląsteles:** Į T25 kolbas įpilkite 3-5 ml PBS (be kalcio ir magnio), o į T75 kolbas - 5-10 ml, kad išplautumėte prilipusias ląsteles.
3. **Įpilkite EDTA tirpalo:** Ląstelių sluoksnį visiškai užpilkite šviežiai paruoštu 0,05 % EDTA tirpalu - 1-2 ml T25 kolboms ir 2,5 ml T75 kolboms.
4. **Inkubavimas:** Inkubuokite kolbas 37 laipsnių Celsijaus temperatūroje 10 minučių.
5. **Įpilkite tripsino ir EDTA tirpalo:** Po inkubacijos į kolbas įpilkite šviežiai paruošto tripsino ir EDTA tirpalo (0,05 % tripsino, 0,025 % EDTA), įsitikinkite, kad ląstelės yra visiškai padengtos - T25 kolboms naudokite 1 ml, o T75 kolboms - 2,5 ml.
6. **Stebėkite atsiskyrimą:** Stebėkite ląsteles, kurios turėtų atsiskirti per 1-2 minutes.
7. **Neutralizuokite tripsiną:** Įpilkite FBS turinčios ląstelių kultūrų terpės, kad tripsino veikla būtų sustabdyta.
8. **Perkelkite ląsteles:** Ląstelių suspensiją išpilstykite į naujas kolbas, iš anksto pripildytas šviežios terpės.

Seeding density

 1×10^4 ląstelės/cm²

Fluid renewal

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.

HaCaT-ras A5 ląstelės | 300494

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°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°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°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°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°C temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelti mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

HaCaT-ras A5 ląstelės | 300494

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*: '31:01:02
B*: '40:01:02, '51:01:01
C*: '03:04:01, '15:02:01
DRB1*: '04:01:01, '15:01:01G
DQA1*: '01:02:01, '03:03:01
DQB1*: '03:01:01, '06:02:01
DPB1*: '03:01:01G, '04:01:01G
E: '01:03:01, '01:03:02