

## Hep-56.1B ląstelės | 400202

## Bendra informacija

## Description

Hep-70.4 hepatomos ląstelių linija yra gauta iš pelių kepenų naviko, konkrečiai iš C57BL/6J pelių padermės. Ši ląstelių linija išsiskiria p53 geno mutacijomis, kurios buvo nustatytos įvairiose stadijose dauginant in vitro. Atlikus 8 pakopos analizę, buvo aptiktas silpnas papildomas signalas, rodantis, kad yra p53 mutacija. Iki 38 eilės buvo nustatytos dvi skirtingos p53 taškinės mutacijos: G:C į C:G transversija 135 kodone ir C:G į G:C transversija 5 egzono 138 kodone. Šios mutacijos lėmė aminorūgščių pokyčius, atitinkamai alanino - į proliną ir cisteino - į triptofaną.

Hep-70.4 ląstelių linija pasižymi morfologiniu fenotipu, kuris labai kinta dauginimosi metu. Kai kurios sublinijos pasižymi epitelio morfologija, o kitos - fibroblastų išvaizda. Šis heterogeniškumas atspindi sudėtingą ląstelių linijos prigimtį ir jos gebėjimą prisitaikyti prie skirtingų auginimo sąlygų. Tai, kad ankstyvosiose stadijose yra ir normalių, ir mutavusių p53 alelių, rodo, kad mutacijos suteikia selektyvų augimo pranašumą, todėl ilgainiui vyrauja mutavę klonai.

Atlikus Hep-70.4 ląstelių linijos tarpinių gijų baltymų analizę, nustatyta, kad paprastieji keratinai K8 ir K18, būdingi normalioms kepenų ląstelėms, taip pat vimentinas ir keratinas K19 yra įvairaus laipsnio. Šie baltymų modeliai patvirtina hepatocitinę ląstelių linijos kilmę ir jos priskyrimą hepatomų linijai. Toliau Hep-70.4 genomo stabilumas buvo įvertintas atlikus DNR pirštų atspaudų analizę, kuri neatskleidė jokių didesnių struktūrinių pakitimų, nors didėjant ląstelių skaičiui buvo pastebėti tam tikrų juostų santykinio intensyvumo pokyčiai.

<b>Organism</b>	Pelė
<b>Tissue</b>	Kepenys
<b>Disease</b>	Hepatocelulinė karcinoma
<b>Synonyms</b>	HEP-56.1B, 56.1B, 56.1b

## Charakteristikos

<b>Breed/Subspecies</b>	C57BL/6J
<b>Age</b>	Suaugusiųjų
<b>Gender</b>	Moteris
<b>Morphology</b>	Į epitelį panašus
<b>Growth properties</b>	Priglundęs

## Reguliavimo duomenys

## Hep-56.1B ląstelės | 400202

<b>Citation</b>	Hep-56.1B (Cytion katalogo numeris 400202)
<b>Biosafety level</b>	1
<b>NCBI_TaxID</b>	10090
<b>CellosaurusAccession</b>	CVCL_5767

## Biomolekuliniai duomenys

<b>Protein expression</b>	Keratinas 8, keratinas 18, vimentinas.
<b>Tumorigenic</b>	Taip, C57BL/6J pelėms
<b>Mutational profile</b>	P53mut (kodonas 277 8 egzone => Argininas -- Treoninas).

## Tvarkymas

<b>Culture Medium</b>	DMEM, š: 4,5 g/l gliukozės, š: 4 mM L-glutamino, š: 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> , š: 1,0 mM natrio piruvato (Cytion gaminio numeris 820300a)
<b>Supplements</b>	Papildykite terpę 10 % FBS
<b>Dissociation Reagent</b>	Accutase
<b>Subculturing</b>	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 perkeltkite jas į naujas kolbas, kuriose jau yra šviežia terpė.
<b>Seeding density</b>	$1 \times 10^4$ ląstelės/cm <sup>2</sup>
<b>Fluid renewal</b>	Kas 3-5 dienas
<b>Post-Thaw Recovery</b>	Atšildžius, išdėliokite ląsteles $5 \times 10^4$ ląstelių/cm <sup>2</sup> tankumu ir leiskite ląstelėms atsigauti po užšaldymo proceso ir prisitvirtinti bent 24 valandas.

## Hep-56.1B ląstelės | 400202

### 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.

### 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  $-150^{\circ}\text{C}$  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  $37^{\circ}\text{C}$  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 perkelkite 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

$37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , 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  $-78^{\circ}\text{C}$  temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelkite mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

## Hep-56.1B ląstelės | 400202

### 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 perkelkite mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

### Storage Conditions

Norėdami ilgai saugoti, įdėkite buteliukus į garų fazės skystą azotą maždaug  $-150\text{--}196\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Laikymas  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje yra priimtinas tik kaip trumpas tarpinis etapas prieš perkeltant 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.