

HCT116-Luc šūnas | 305787

Vispārīga informācija

Description

HCT 116-Luc ir cilvēka kolorektālās karcinomas šūnu līnijas HCT 116 atvasinājums, kas ekspresē luciferāzi. Šī līnija tika radīta, veicot transdukciju ar konstruktu, kas kodē *Photinus pyralis* ugunskrēslīņa luciferāzi kopā ar puromicīna rezistences kaseti (*pac*), tādējādi reportera ekspresija ir konstitutīva, nevis atkarīga no signālceļa. Tādējādi bioluminiscences signāls ir proporcionāls dzīvotspējīgo šūnu skaitam, kas padara šo modeli piemērotu neinvazīvai audzēja slodzes izsekošanai in vivo, kā arī ātrai, uz šķīvjiem balstītai šūnu dzīvotspējas un proliferācijas kvantificēšanai in vitro.

Sākotnējā HCT 116 līnija šajā atvasinājumā saglabā savas raksturīgās iezīmes, tostarp mikrosatelītu nestabilitāti ar nepilnīgu DNS nesakrītības labošanu, savvaļas tipa TP53 un gandrīz diploīdu kariotipu. Tās mutāciju fons ietver KRAS p.Gly13Asp, PIK3CA p.His1047Arg, heterozigotu CTNNB1 p.Ser45del, kas stabilizē β-katenīnu un veicina konstitutīvu Wnt signālu pārraidi, kā arī homozigotas frameshift mutācijas TGFR2 un ACVR2A gēnos, kas ir tipiskas MSI kolorektālajiem audzējiem. Papildu varianti ir sastopami gēnos CDKN2A, EP300, BRCA2 un PPM1D. Reportēra stabilā integrācija ļauj veikt ortotopisko un subkutāno ksenotransplantātu garenvirziena attēlveidošanu vienā un tajā pašā dzīvniekā, tādējādi samazinot kohortas lielumu un novēršot nepieciešamību pēc galīgajiem iznākumiem katrā laika punktā. Puromicīna selekcija tiek izmantota, lai saglabātu transgēnu rutīniskās pavairošanas laikā.

Šo līniju plaši izmanto pirmsklīniskajā onkoloģijā, citotoksisko un mērķtiecīgo līdzekļu efektivitātes pētījumos, metastāžu un audzēju mērķtiecīgas migrācijas modeļos, kā arī augstas caurlaidspējas citotoksicitātes skrīningā, kur luminescences rādītājs nodrošina plašāku dinamisko diapazonu nekā kolorimetriskie testi. Tā kā luciferāzes ekspresija netiek regulēta ar indukciju, signāls atspoguļo šūnu skaitu un metabolisko stāvokli, nevis konkrēta metabolisma ceļa aktivitāti, tādēļ savienojumi, kas maina ATP līmeni vai šūnu vielmaiņu, var ietekmēt luminescenci neatkarīgi no šūnu iznīcināšanas. Apstiprināšanai ieteicami ortogonāli dzīvotspējas testi, un, interpretējot reakcijas uz DNS bojājošiem līdzekļiem un imūnmodulējošām terapijām, jāņem vērā HCT 116 šūnu fons ar defektīvu nesakrītību labošanu.

Organism

Cilvēks

Tissue

Resnās zarnas

Disease

Resnās zarnas karcinoma

Raksturojums

Age

48 gadi

Gender

Vīrieši

Ethnicity

Kaukāzietis

Morphology

Epitēlijevīdīgs

HCT116-Luc šūnas | 305787

Growth properties	Adherent
--------------------------	----------

Normatīvie dati

Citation	HCT116-Luc (Cytion kataloga numurs 305787)
-----------------	--

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

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

CellosaurusAccession	CVCL_C8WT
-----------------------------	-----------

GMO Status	GMO-S1: Šī šūnu līnija satur stabili integrētu ugunskrēsliņa luciferāzes reporterķēšu (Luc2, kodonu optimizēta), kas ievadīta, izmantojot replikācijas nespējīgu lentivīrusa transdukciju. Iegūtā poliklonālā šūnu populācija tika uzturēta puromicīna selekcijas apstākļos (1–5 µg/ml). Ir nepieciešama S1 drošības klase. Šī klasifikācija attiecas tikai uz Vāciju un citās valstīs var atšķirties.
-------------------	--

Biomolekulārie dati

Antigen expression	Luc2 (spožā muša, kodonu optimizēts)
---------------------------	--------------------------------------

Mutational profile	Mutācija: p.Lys437Argfs*5, homozigota; Mutācija: p.Ile2675Aspfs*6, heterozigota; Mutācija: p.Arg24Serfs*20, heterozigota; Mutācija: p.Ser45del, heterozigota; Mutācija: p.Met1470Cysfs*22, heterozigota; Mutācija: p.Asn1700Thrfs*9, heterozigota; Mutācija: p.Gly13Asp, heterozigota; Mutācija: p.His1047Arg, heterozigota; Mutācija: p.Leu450Ter, heterozigota; Mutācija: p.Lys128Serfs*35, homozigota
---------------------------	--

Darbs ar

Culture Medium	McCoy's 5a, w: 3,0 g/l glikoze, w: stabils glutamīns, w: 2,0 mM nātrija piruvāts, w: 2,2 g/l NaHCO ₃ (Cytion izstrādājuma numurs 820200a)
-----------------------	--

Supplements	Papildināt barotni ar 10% FBS
--------------------	-------------------------------

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

Seeding density	1–3 × 10 ⁴ /cm ²
------------------------	--

HCT116-Luc šūnas | 305787**Freeze medium**

Kā kriokonservēšanas barotni mēs izmantojam pilnvērtīgu augšanas barotni (ieskaitot FBS) + 10 % DMSO, lai nodrošinātu pietiekamu dzīvotspēju pēc atkausēšanas, vai CM-1 (Cytion kataloga numurs 800100), kas ietver optimizētus osmoprotektorus un metaboliskos stabilizatorus, lai uzlabotu atveseļošanos un samazinātu krioinducēto stresu.

Thawing and Culturing Cells

1. Pārliecinieties, ka pēc piegādes flakons paliek dziļi sasaldēts, jo šūnas tiek sūtītas uz sausā ledus, lai pārvadāšanas laikā saglabātu optimālu temperatūru.
2. Pēc saņemšanas vai nu nekavējoties uzglabāt kriovialu temperatūrā, kas zemāka par -150 °C, lai nodrošinātu šūnu integritātes saglabāšanu, vai arī turpināt 3. posmu, ja nepieciešama tūlītēja kultivēšana.
3. Tūlītējas kultivēšanas gadījumā ātri atkausējiet flakonu, iegremdējot to 37°C ūdens vannā ar tīru ūdeni un antibakteriālu līdzekli, viegli maisot 40-60 sekundes, līdz paliek neliels ledus gabaliņš.
4. Visas turpmākās darbības veiciet sterilos apstākļos plūsmas nosūcējā, pirms atvēršanas dezinficējot kriovialu ar 70% etanolu.
5. Uzmanīgi atveriet dezinficēto flakonu un pārnēsiet šūnu suspensiju 15 ml centrifūgas mēģenē, kurā ir 8 ml istabas temperatūras barotnes, uzmanīgi samaisot.
6. Centrifugējiet maisījumu ar 300 x g 3 minūtes, lai atdalītu šūnas, un uzmanīgi izmetiet virskārtu, kas satur saldēšanas barotnes atlikumus.
7. Viegli resuspendēt šūnu granulas 10 ml svaigas barotnes. Adhēzijas šūnu gadījumā suspensiju sadalīt divās T25 kolbās; suspensijas kultūrām visu barotni pārnēsāt vienā T25 kolbā, lai veicinātu efektīvu šūnu mijiedarbību un augšanu.
8. Ievērojiet noteiktos subkultūru protokolus, lai nodrošinātu nepārtrauktu šūnu līnijas augšanu un uzturēšanu, tādējādi nodrošinot uzticamus eksperimentu rezultātus.

Incubation Atmosphere

37°C, 5%_{CO2}, mitrināta atmosfēra.

Shipping Conditions

Kriokonservētas šūnu līnijas tiek sūtītas uz sausā ledus apstiprinātā, izolētā iepakojumā ar pietiekamu dzesēšanas šķidruma daudzumu, lai visā transportēšanas laikā uzturētu aptuveni -78 °C temperatūru. Pēc saņemšanas nekavējoties pārbaudiet iepakojumu un nekavējoties pārvietojiet flakonus uz atbilstošu uzglabāšanas vietu.

HCT116-Luc šūnas | 305787

Storage Conditions

Ilgstošai uzglabāšanai flakonus ievietojiet šķidrā slāpekļī ar tvaika fāzi aptuveni -150 līdz -196 °C temperatūrā. Uzglabāšana -80 °C temperatūrā ir pieļaujama tikai kā īss starpposms pirms pārvietošanas uz šķidro slāpekli.

Kvalitātes kontrole un molekulārā analīze

Sterility

Mikoplazmas piesārņojums tiek izslēgts, izmantojot gan uz PCR balstītus testus, gan uz luminiscenci balstītas mikoplazmas noteikšanas metodes.

Lai pārliecinātos, ka nav baktēriju, sēnīšu vai rauga piesārņojuma, šūnu kultūras katru dienu vizuāli pārbauda.