

NCI-H1299-RFP šūnas | 300272

Vispārīga informācija

Description

NCI-H1299 RFP šūnas, kas modificētas, lai iekļautu DAPK1 gēna reportieri, ir ne tikai noderīgas specifisku gēnu aktivizācijas izpētei, bet arī sniedz plašāku izpratni par to, kā šūnas reaģē uz epigenētiskajām zālēm visā pasaulē. Izmantojot metodi, ko dēvē par gēnu ekspresijas analīzes vāciņu (CAGE), pētnieki ir spējusi detalizēti noteikt izmaiņas transkripcijas sākumpunktos visā genomā, reaģējot uz ārstēšanu ar DNMTi (DAC), HDACi (SAHA vai SB939) vai to kombinācijām. Šī metode atklāj ne tikai sagaidāmo DAPK1 gēna reaktivāciju, bet arī jaunu transkripcijas sākuma vietu rašanos, ko sauc par ārstēšanas izraisītām neanotētām TSS (TINAT), īpaši ārstēšanas ar zālēm laikā. Šīs jaunās sākuma vietas parasti atrodas genoma reģionos, kuros parasti neveidojas olbaltumvielas, un to rezultātā rodas jaunas RNS molekulas, kas potenciāli varētu kodēt olbaltumvielas.

Turpmāka analīze liecina, ka šīs jaunās RNS molekulas dažkārt var saplūst ar esošajām, veidojot tā sauktos TINAT-eksonu saplūšanas transkriptus. Atkarībā no tā, kā šie transkripti tiek sajaukti, tie var pārvērsties jaunos, netipiskos proteīnos. Šis process ir apstiprināts, izmantojot laboratorijas metodes, kas pierāda, ka šie transkripti patiešām var radīt jaunas olbaltumvielu formas. Šīs olbaltumvielas var nenormāli mijiedarboties šūnā vai imūnsistēmā tās var atpazīt kā svešas, tādējādi potenciāli piedāvājot jaunus mērķus vēža terapijai.

Šo TINAT aktivizācija ir saistīta ar sarežģītām izmaiņām gan DNS metilēšanā, gan histonu modifikācijās, ilustrējot šo epigenētisko faktoru sarežģīto mijiedarbību zāļu iedarbības laikā. Jo īpaši DAC un SB939 kombinēta lietošana uzrāda lielāku iedarbību, palielinot šo jauno transkriptu ekspresiju vairāk nekā tad, ja lieto kādu no šīm zālēm atsevišķi. Izpratne par šīm mijiedarbībām un to rezultātiem palīdz noskaidrot, kā epigenētiskā terapija maina šūnu uzvedību, un paver iespējas jauniem vēža ārstēšanas veidiem, kas izmanto šīs sarežģītās molekulārās pārmaiņas.

Organism

Cilvēks

Tissue

Plaušas

Disease

Lielo šūnu karcinoma

Raksturojums

Morphology

Epitēlijveidīgs

Growth properties

Adherent

Normatīvie dati

Citation

NCI-H1299-EGFP ar G418 rezistenci un apklusinātu reportergēnu (DKFZ # P-1045) (Cytion kataloga numurs 300272)

Biosafety level

1

NCI-H1299-RFP šūnas | 300272

NCBI_TaxID 9606

Biomolekulārie dati

Darbs ar

Culture Medium RPMI 1640, w: 2,0 mM stabils glutamīns, w: 2,0 g/L NaHCO₃ (Cytion izstrādājuma numurs 820700a)**Supplements** Papildināt barotni ar 10% FBS**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Noņemt veco barotni no pielipušajām šūnām un mazgāt tās ar PBS, kurā nav kalcija un magnija. T25 kolbām izmantojiet 3-5 ml PBS, bet T75 kolbām - 5-10 ml. Pēc tam pilnībā pārklājiet šūnas ar Accutase, izmantojot 1-2 ml T25 kolbām un 2,5 ml T75 kolbām. Ļaujiet šūnām inkubēties istabas temperatūrā 8-10 minūtes, lai tās atdalītos. Pēc inkubācijas uzmanīgi samaisiet šūnas ar 10 ml barotnes, lai tās atkārtoti suspendētu, pēc tam centrifugējiet 3 minūtes ar 300xg. Izmetiet supernatantu, atkārtoti suspendējiet šūnas svaigā barotnē un pārvietojiet tās jaunās kolbās, kurās jau ir svaiga barotne.**Fluid renewal** 2 līdz 3 reizes nedēļā**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.

NCI-H1299-RFP šūnas | 300272

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 pārnesiet 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 pārnest 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% CO_2 , mitrināta atmosfēra.

Flask Coating

Neviens

Freezing Procedure

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

NCI-H1299-RFP šūnas | 300272

**Shipping
Conditions**

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

**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 starposms pirms pārvietošanas uz šķidro slāpekli.

Kvalitātes kontrole / Ģenētiskais profils / HLA

Sterility

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

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