

B-LCL-HROC69 šūnas | 300864**Vispārīga informācija****Description**

B-LCL-HROC69 ir Epšteina-Barra vīrusa (EBV) imortalizēta B limfoblastoīdu šūnu līnija, kas izveidota no audzēja infiltrējošām B šūnām (TiBc), kas izdalītas no primārā kolorektālā karcinoma parauga ar nosaukumu HROC69. Mātes audzējs cēlies no pieaugušā vīrieša pacienta ar labās puses kolorektālo karcinomu, kas ir parasts sporādiskais tips un atrodas progresējošā stadijā. B šūnas tika izdalītas no svaigi izgriezta audzēja audiem un imortalizētas ex vivo, izmantojot EBV ražojošās B95/8 marmoset šūnu līnijas supernatantu ciklosporīna A klātbūtnē, lai nomāktu T un NK šūnu izaugšanu. EBV transformētu B šūnu klonu izaugsme parasti notika vairāku nedēļu laikā, un klonalitāte tika apstiprināta ar imūnglobulīna smagās un vieglas ķēdes gēnu pārkārtojuma analīzi, izmantojot BIOMED-2 multipleksa PCR protokolus.

B-LCL-HROC69 izdalīja imūnglobulīnu A (IgA), kā noteikts ar izotipa specifisku ELISA ilgtermiņa kultūras supernatantu analīzi. Pretstatā vairākām paralēli izveidotām IgG ražojošām TiBc līnijām, IgA, kas iegūts no HROC69, sākotnējās funkcionālās skrīninga analīzēs netika turpmāk raksturots attiecībā uz audzēja šūnu saistīšanos. Svarīgi, ka bez eksogēna EBV nebija novērota spontāna B šūnu kultūru izaugsme, kas liecina, ka imortalizācija ir in vitro process, nevis latentas EBV infekcijas in vivo sekas. Tādējādi B-LCL-HROC69 ir monoklonāls, antigēnu pieredzējis audzēju infiltrējošs B šūnu modelis, kas piemērots humoro imūnreakciju izpētei kolorektālā karcinoma mikroapvidū un potenciālai audzēju saistītu antigēnu identifikācijai, kurus atpazīst lokāli izplatīti B šūnu kloni.

Organism

Cilvēks

Tissue

Perifērās asinis

Disease

Karcinoma

Synonyms

B-LCL CO69, Bc HROC69, TiBcHROC69

Raksturojums**Age**

62 gadi

Gender

Vīrieši

Ethnicity

Kaukāzietis

Morphology

Apaļas šūnas

Cell type

B limfoblasts

Growth properties

Apturēšana

B-LCL-HROC69 šūnas | 300864**Normatīvie dati**

Citation	B-LCL-HROC69 (Cytion kataloga numurs 300864)
Biosafety level	2
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_YD53

Biomolekulārie dati

Surface antigens	CD19
Viruses	Transformants: EBV

Darbs ar

Culture Medium	RPMI 1640, w: 2,0 mM stabils glutamīns, w: 2,0 g/L NaHCO ₃ (Cytion izstrādājuma numurs 820700a)
Supplements	Papildināt barotni ar 10% termiski inaktivētu FBS
Subculturing	Viegli homogenizējiet šūnu suspensiju kolbā, pipetējot uz augšu un uz leju, pēc tam ņemiet reprezentatīvu paraugu, lai noteiktu šūnu blīvumu uz ml. Atšķaidiet suspensiju, lai sasniegtu šūnu koncentrāciju 1×10^5 šūnas/ml ar svaigu kultūras barotni, un sadaliet pielāgoto suspensiju jaunās kolbās turpmākai kultivēšanai.
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.

B-LCL-HROC69 šūnas | 300864**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 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 šķidruma daudzumu, lai visā transportēšanas laikā uzturētu aptuveni -78 °C temperatūru. Pēc saņemšanas nekavējoties pārbaudiet iepakojumu un nekavējoties pārvietojiet flakonus uz atbilstošu uzglabāšanas vietu.

B-LCL-HROC69 šūnas | 300864

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.

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 un molekulārā analīze

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.