

HaCaT-ras A5 šūnas | 300494

Vispārīga informācija

Description

HaCaT-ras A5 šūnas ir spontāni imortizēta cilvēka ādas keratinocītu šūnu līnija, kas nav tumorogēna un ir noderīga audzēja mikrovides mijiedarbības un ādas karcinomas progresēšanas pētījumos. Šīm šūnām, kas iegūtas no 62 gadus veca kaukāzieša vīrieša, ir veikta klonu selekcija un mutagenēze, kas kopā ar autokrīno augšanas faktoru regulāciju ļauj veidot lēni augošus, augsti diferencētus labdabīgus cistiskus audzējus Balb/c-nu/nu pelēm. Tas padara tās par vērtīgu modeli šūnu dinamikas un audzēju progresēšanas molekulāro mehānismu izpētei in vivo.

HaCaT-ras A5 šūnas ir īpaši noderīgas, lai noskaidrotu sarežģīto mijiedarbību starp audzēja šūnām un apkārtējām stromas šūnām, tostarp fibroblastiem, imūnšūnām un endotēlija šūnām. Šo mijiedarbību nodrošina dažādu signālmolekulu, piemēram, augšanas faktoru, citokīnu un proteāžu, sekrēcija, no kurām galvenā loma ir interleikīnam-6 (IL-6). Ir zināms, ka daudzu vēža veidu gadījumā IL-6 ir disregulēts, galvenokārt pārmērīgas STAT3 transkripcijas faktora ekspresijas vai pastāvīgas aktivizācijas dēļ.

Pētījumi liecina, ka IL-6 stimulācija HaCaT-ras A5 šūnām ievērojami palielina to proliferāciju, izmantojot JAK/STAT signalizācijas ceļu, bet fibroblastus neietekmē, jo šo ceļu spēcīgāk inhibē SOCS3, kas ir šī ceļa negatīvs regulators. Šī atšķirīgā reakcija ir atspoguļota matemātiskā modelī, kas apraksta STAT3 un SOCS3 dinamiku, sniedzot dziļāku izpratni par šūnu specifiskajām signalizācijas kaskādēm.

Turklāt IL-6 ne tikai tieši ietekmē HaCaT-ras A5 šūnu proliferāciju, bet arī netieši ietekmē šūnu vidi, aktivizējot tādu augšanas faktoru tīklu kā HGF, KGF, VEGF un IL-8. Gēnu ekspresijas analīze, kurā iesaistīti vairāk nekā 16 000 gēnu, atklāja, ka IL-6 stimulācija palielina 19 gēnu, kas saistīti ar interferona signāla ceļu gan HaCaT-ras A5 šūnās, gan fibroblastos, kas korelē ar novēroto augšanas inhibīciju fibroblastos.

SerpinB4 izšķirošās lomas atklāšana HaCaT-ras A5 šūnu proliferācijā, kas apstiprināta, veicot siRNA izslēgšanas eksperimentus, uzsver sarežģīto IL-6 regulāciju gan audzēja, gan stromas šūnās. Šī visaptverošā izpratne par IL-6 lomām palielina iespējas izstrādāt mērķtiecīgas terapeitiskās stratēģijas, kuru mērķis ir modulēt IL-6 signalizācijas ceļus audzēja mikrovidē.

Kopumā HaCaT-ras A5 šūnas ir spēcīgs modelis, lai izpētītu sarežģīto mijiedarbību audzēja mikrovielā, paverot ceļu jaunām pieejām vēža pētniecībā un terapijas izstrādē.

Organism Cilvēks

Tissue Āda

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

Raksturojums

Age 62 gadi

Gender Vīrieši

Ethnicity Kaukāzietis

HaCaT-ras A5 šūnas | 300494

Cell type Keratinocīti

Growth properties Adherent

Normatīvie dati

Citation HaCaT-ras A5 (Cytion kataloga numurs 300494)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

CellosaurusAccession CVCL_xK16

GMO Status GMO-S1: Šī HaCaT-ras A5 līnija satur plazmīdā ievietotu c-Ha-ras onkogēna konstrukciju epitēlija transformācijas pētījumiem. Šī klasifikācija attiecas tikai uz Vāciju un var atšķirties citur.

Biomolekulārie dati

Protein expression P53 (+), CEA (+),

Tumorigenic Labdabīgu audzēju veidošanās Balb/c-nu/nu pelēm.

Karyotype Aneuploīdi (hipotetraploīdi)

Darbs ar

Culture Medium DMEM, w: 4,5 g/l glikozes, w: 4 mM L-glutamīna, w: 3,7 g/l NaHCO₃, w: 1,0 mM nātrija piruvāta (Cytion izstrādājuma numurs 820300a)

Supplements Papildināt barotni ar 10% FBS

Dissociation Reagent EDTA (0,05 %) un tripsīna (0,1 %) maisījums 1:1 katru reizi jā sagatavo pirms šūnu atdalīšanas, izmantojot PBS bez Ca²⁺ un Mg²⁺, lai nodrošinātu fizioloģisku osmolaritāti. Nav ieteicams izmantot lietošanai gatavus tripsīna/EDTA maisījumus, jo tā rezultātā var veidoties šūnu salīpumi. Kā alternatīvu tripsīna/EDTA vietā var izmantot TrypLETM Express (Life Technologies). Jāievēro ražotāja protokols.

HaCaT-ras A5 šūnas | 300494

Subculturing

1. **Izmetiet veco mediju:** Izņemiet veco barotni no kolbām.
2. **Izskalojiet šūnas:** Pievienojiet 3-5 ml PBS (bez kalcija un magnija) T25 kolbām vai 5-10 ml T75 kolbām, lai izskalotu pielipušās šūnas.
3. **Pievienot EDTA šķīdumu:** Pilnībā pārklājiet šūnu slāni ar svaigi sagatavotu 0,05 % EDTA šķīdumu - T25 kolbām izmantojiet 1-2 ml, bet T75 kolbām - 2,5 ml.
4. **Inkubēšana:** Kolbas inkubēt 37 °C temperatūrā 10 minūtes.
5. **Pievienojiet tripsīna/EDTA šķīdumu:** Pēc inkubācijas kolbām pievieno svaigi sagatavotu tripsīna/EDTA šķīdumu (0,05 % tripsīns, 0,025 % EDTA), nodrošinot, ka šūnas ir pilnībā aptvertas - T25 kolbām izmanto 1 ml, bet T75 kolbām - 2,5 ml.
6. **Uzraudzīt atdalīšanos:** Novērojiet šūnas, kurām vajadzētu atdalīties 1-2 minūšu laikā.
7. **Neitralizēt tripsīnu:** Pievienojiet FBS saturošu šūnu barotni, lai apturētu tripsīna aktivitāti.
8. **Pārnest šūnas:** Šūnu suspensiju iepildīt jaunās kolbās, kas iepriekš piepildītas ar svaigu barotni.

Seeding density

 1×10^4 šūnas/cm²

Fluid renewal

2 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.

HaCaT-ras A5 šūnas | 300494

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.

HaCaT-ras A5 šūnas | 300494

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

HLA alēles

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