

Wilms8 šūnas | 300416

Vispārīga informācija

Description

Wilms8 šūnu līnija tika iegūta no primārā Wilms audzēja pediatrika pacienta ar WT1 dzimumlīniju mutāciju. Šai šūnu līnijai ir raksturīga homozigotiska bezjēdzīga WT1 gēna mutācija (c.1168 C>T, p.R390X), kas izraisa pilnīgu WT1 funkcijas zudumu. WT1 ir ļoti svarīgs normālai nieru attīstībai, un tā inaktivācija ir raksturīga dažiem agresīviem Vilmsa audzēju apakštipiem, jo īpaši tiem, kuriem ir mezenhīma diferenciacija. Tāpēc Wilms8 ir vērtīgs modelis, lai pētītu WT1 zuduma ietekmi uz audzēju ģenēzi, jo īpaši saistībā ar Wilms audzējiem, kas veidojas ar izteiktu stromālo komponentu.

Papildus WT1 mutācijai Wilms8 šūnās ir mutācija CTNNB1 gēnā (p.S45A), kas kodē β -katenīnu, galveno Wnt signalizācijas ceļa regulatoru. Mutācija pie serīna 45 pārtrauc normālu fosforilēšanas procesu, kas izraisa β -Catenin degradāciju, izraisot tā stabilizāciju un uzkrāšanos kodolā. Tas izraisa konstitutīvu Wnt signalizācijas aktivizāciju, kas veicina šūnu proliferāciju un sekmē Wilms8 šūnu līnijas onkogēnās īpašības. Savstarpējā mijiedarbība starp WT1 zudumu un aberantu Wnt signalizāciju Wilms8 līnijā padara to par būtisku modeli, lai izprastu molekulāros mehānismus, kas ir šo ceļu pamatā Wilms audzēju bioloģijā.

Wilms8 šūnām ir mezenhīma fenotips, ko raksturo vimentīna ekspresija un epitēlija marķieru, piemēram, citokeratīna, neesamība. Tas atbilst sākotnējā audzējā novērotajai stromālajai diferenciacijai. Šīm šūnām ir ierobežota spēja turpināt mezenhīmo diferenciaciju, piemēram, veidojot muskuļiem līdzīgas šūnas īpašos apstākļos. Wilms8 proteomikas analīzes ir atklājušas vairāku receptoru tirozīna kināžu (RTK), tostarp PDGFR β un AXL, aktivizāciju, kas ir iesaistītas tādos svarīgos procesos kā šūnu izdzīvošana, migrācija un proliferācija. Pakārtoto signalizācijas ceļu, jo īpaši MAPK un PI3K/AKT ceļu, aktivizācija vēl vairāk veicina Wilms8 šūnu agresīvās īpašības.

Kopumā Wilms8 šūnu līnija kalpo kā būtisks rīks, lai pētītu molekulāro pamatu Wilms audzējiem, ko izraisa WT1 zudums un aberatīva Wnt signalizācija. Tās ģenētiskās un fenotipiskās īpašības padara to par stabilu platformu, lai pētītu mijiedarbību starp šiem svarīgajiem ceļiem un identificētu potenciālos terapeitiskos mērķus Vilmsa audzējiem ar stromālo komponentu.

Organism Cilvēks

Tissue Nieres

Disease Vilmsa audzējs

Applications In vitro šūnu kultūras modelis. Bioķīmiskie pētījumi

Raksturojums

Age 8 mēneši

Gender Vīrieši

Ethnicity Kaukāzietis

Wilms8 šūnas | 300416

Morphology Vārpstas formas

Cell type Vilmsa šūnas

Growth properties Adherent

Normatīvie dati

Citation Wilms8 (Cytion kataloga numurs 300416)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9606

CellosaurusAccession CVCL_A5SJ

Biomolekulārie dati

Mutational profile WT1 mutācijas statuss: homozigotiska c.1168C>T, p.390x, LOH: , CTNNB1 mutācijas statuss: heterozigotiska TCT>GCT, p.S45A

Darbs ar

Culture Medium MSCGM komplekts (no Lonza)

Dissociation Reagent Accutase

Subculturing Noņem 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.

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.

Wilms8 šūnas | 300416

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.

Wilms8 šūnas | 300416

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*: '02:01:01, '03:01:01

B*: '15:01:01, '37:01:01

C*: '04:01:01, '06:02:01

DRB1*: '08:01:01G, '11:01:01

DQA1*: '04:01:01, '05:05:01

DQB1*: '03:01:01, '04:02:01

DPB1*: '03:01:01, '06:01:01

E: '01:03:02