

## Hep-56.1B šūnas | 400202

## Vispārīga informācija

## Description

Hep-70.4 hepatomas šūnu līnija ir iegūta no peļu aknu audzēja, īpaši no C57BL/6J peļu celma. Šī šūnu līnija izceļas ar p53 gēna mutācijām, kas tika konstatētas dažādos in vitro pavairošanas posmos. Pie 8. pasāžas tika konstatēts vājš papildu signāls, veicot viena virknes konformācijas polimorfisma (SSCP) analīzi, kas norāda uz p53 mutācijas klātbūtni. Līdz 38. pārejai tika konstatētas divas atšķirīgas p53 punktmutācijas: G:C uz C:G transversija pie 135. kodona un C:G uz G:C transversija pie 138. kodona 5. eksonā. Šīs mutācijas izraisīja aminoskābju maiņu attiecīgi no alanīna uz prolīnu un no cisteīna uz triptofānu.

Hep-70.4 šūnu līnija uzrāda morfoloģisku fenotipu, kas tās pavairošanas laikā ievērojami mainās. Dažām apakšlīnijām piemīt epitēlija morfoloģija, bet citām - fibroblastiem līdzīgs izskats. Šī heterogenitāte atspoguļo šūnu līnijas sarežģīto raksturu un tās pielāgošanās spēju dažādos kultivēšanas apstākļos. Gan normālu, gan mutējušu p53 alēļu klātbūtne agrīnajās pasāžās liecina, ka mutācijas piešķir selektīvu augšanas priekšrocību, kas laika gaitā noved pie mutēto klonu pārsvara.

Hep-70.4 šūnu līnijas starpfilamentu proteīnu analīze atklāja normālām aknu šūnām raksturīgo vienkāršo keratīnu K8 un K18, kā arī vimentīna un keratīna K19 ekspresiju dažādās pakāpēs. Šie proteīnu modeļi apstiprina šūnu līnijas hepatocītisko izcelsmi un tās klasifikāciju kā hepatomas līniju. Hep-70.4 genoma stabilitāte tika novērtēta arī ar DNS pirkstu nospiedumu analīzes palīdzību, kas neatklāja nekādas būtiskas strukturālas anomālijas, lai gan, palielinoties pasāžu skaitam, tika novērotas izmaiņas dažu joslu relatīvajā intensitātē.

<b>Organism</b>	Pele
<b>Tissue</b>	Aknas
<b>Disease</b>	Hepatocelulārā karcinoma
<b>Synonyms</b>	HEP-56.1B, 56.1B, 56.1b

## Raksturojums

<b>Breed/Subspecies</b>	C57BL/6J
<b>Age</b>	Pieaugušo
<b>Gender</b>	Sievietes
<b>Morphology</b>	Epitēlijveidīgs
<b>Growth properties</b>	Adherent

## Normatīvie dati

## Hep-56.1B šūnas | 400202

<b>Citation</b>	Hep-56.1B (Cytion kataloga numurs 400202)
<b>Biosafety level</b>	1
<b>NCBI_TaxID</b>	10090
<b>CellosaurusAccession</b>	CVCL_5767

## Biomolekulārie dati

<b>Protein expression</b>	Keratīns 8, keratīns 18, vimentīns.
<b>Tumorigenic</b>	Jā, C57BL/6J pelēm
<b>Mutational profile</b>	P53mut (kodons 277 8. eksonā => arginīns -- treonīns).

## Darbs ar

<b>Culture Medium</b>	DMEM, w: 4,5 g/l glikozes, w: 4 mM L-glutamīna, w: 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> , w: 1,0 mM nātrija piruvāta (Cytion izstrādājuma numurs 820300a)
<b>Supplements</b>	Papildināt barotni ar 10% FBS
<b>Dissociation Reagent</b>	Accutase
<b>Subculturing</b>	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.
<b>Seeding density</b>	$1 \times 10^4$ šūnas/cm <sup>2</sup>
<b>Fluid renewal</b>	Ik pēc 3 līdz 5 dienām
<b>Post-Thaw Recovery</b>	Pēc atkausēšanas izkļiedējiet šūnas uz šķīvja ar blīvumu $5 \times 10^4$ šūnas/cm <sup>2</sup> un ļaujiet šūnām atgūties no sasaldēšanas procesa un pielipt vismaz 24 stundas.

## Hep-56.1B šūnas | 400202

### 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  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ , lai nodrošinātu šūnu integritātes saglabāšanu, vai arī turpināt 3. posmu, ja nepieciešama tūlītēja kultivēšana.
3. Tūlītējas kultivēšanas gadījumā ātri atkausējiet flakonu, iegremdējot to  $37^{\circ}\text{C}$  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  $300 \times g$  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

$37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , mitrināta atmosfēra.

### Flask Coating

Optimālai piestiprināšanai un dzīvotspējai pēc atkausēšanas ieteicams izmantot **ar kolagēnu pārklātas kolbas vai plates**.

## Hep-56.1B šūnas | 400202

### 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.

### 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.