

Komórki HCT116-Luc | 305787

Informacje ogólne

Description

HCT 116-Luc to pochodna ludzkiej linii komórkowej raka jelita grubego HCT 116, w której ekspresjonowana jest lucyferaza. Linię tę wyhodowano poprzez transdukcję konstrukcją kodującą lucyferazę świetlika *Photinus pyralis* wraz z kasetą oporności na puromycynę (*pac*), dzięki czemu ekspresja reporterowa ma charakter konstytutywny, a nie zależny od szlaku metabolicznego. Sygnał bioluminescencyjny jest zatem proporcjonalny do liczby żywych komórek, co sprawia, że model ten nadaje się do nieinwazyjnego monitorowania obciążenia nowotworowego in vivo oraz do szybkiej, opartej na płytках kwantyfikacji żywotności i proliferacji komórek in vitro.

Linia macierzysta HCT 116 zachowuje w tej pochodnej swoje charakterystyczne cechy, w tym niestabilność mikrosatelitarna z niedoborem naprawy niedopasowań DNA, gen TP53 typu dzikiego oraz kariotyp zbliżony do diploidalnego. Jej tło mutacyjne obejmuje mutację KRAS p.Gly13Asp, PIK3CA p.His1047Arg, heterozygotyczną mutację CTNNB1 p.Ser45del, która stabilizuje β -kateninę i stymuluje konstytutywną sygnalizację Wnt, oraz homozygotyczne mutacje przesunięcia ramki odczytu w genach TGFBR2 i ACVR2A, typowe dla nowotworów jelita grubego o niestabilności mikrosatelitarnej (MSI). Dodatkowe warianty występują w genach CDKN2A, EP300, BRCA2 i PPM1D. Stabilna integracja reportera umożliwia obrazowanie w czasie ortotopicznych i podskórnych przeszczepów heterogenicznych u tego samego zwierzęcia, co zmniejsza liczebność kohort i eliminuje konieczność stosowania punktów końcowych w każdym punkcie czasowym. Do utrzymania transgenu podczas rutynowej ekspansji stosuje się selekcję puromycyną.

Linia ta znajduje szerokie zastosowanie w onkologii przedklinicznej, w badaniach skuteczności środków cytotoksycznych i leków celowanych, w modelach przerzutów i migracji nowotworów oraz w wysokoprzepustowym badaniu przesiewowym cytotoksyczności, gdzie odczyt luminescencyjny oferuje szerszy zakres dynamiczny niż testy kolorymetryczne. Ponieważ ekspresja lucyferazy nie podlega kontroli indukowalnej, sygnał odzwierciedla liczbę komórek i stan metaboliczny, a nie aktywność konkretnego szlaku, więc związki zmieniające poziom ATP lub metabolizm komórkowy mogą wpływać na luminescencję niezależnie od zabijania komórek. W celu potwierdzenia wyników zaleca się przeprowadzenie ortogonalnych testów żywotności, a przy interpretacji reakcji na czynniki uszkadzające DNA i terapie immunomodulujące należy uwzględnić niedobór naprawy niedopasowań w komórkach HCT 116.

Organism

Człowiek

Tissue

Colon

Disease

Rak okrężnicy

Charakterystyka

Age

48 lat

Gender

Mężczyzna

Ethnicity

Kaukaski

Komórki HCT116-Luc | 305787

Morphology Podobny do nabłonka**Growth properties** Adherent

Dane regulacyjne

Citation HCT116-Luc (numer katalogowy Cytion 305787)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_C8WT

GMO Status GMO-S1: Ta linia komórkowa zawiera stabilnie zintegrowaną kasetę reporterową z lucyferazą świetlika (Luc2, zoptymalizowaną pod kątem kodonów), wprowadzoną za pomocą transdukcji lentiwirusowej bez zdolności do replikacji. Powstałą populację komórek poliklonalnych utrzymywano pod selekcją puromycyną (1–5 µg/ml). Wymagany jest poziom bezpieczeństwa S1. Klasyfikacja ta obowiązuje wyłącznie na terenie Niemiec i może różnić się w innych krajach.

Dane biomolekularne

Antigen expression Luc2 (światlik, zoptymalizowany pod kątem kodonów)

Mutational profile Mutacja: p.Lys437Argfs*5, homozygotyczna; Mutacja: p.Ile2675Aspfs*6, heterozygotyczna; Mutacja: p.Arg24Serfs*20, heterozygotyczna; Mutacja: p.Ser45del, heterozygotyczna; Mutacja: p.Met1470Cysfs*22, heterozygotyczna; Mutacja: p.Asn1700Thrfs*9, heterozygotyczna; Mutacja: p.Gly13Asp, heterozygotyczna; Mutacja: p.His1047Arg, heterozygotyczna; Mutacja: p.Leu450Ter, heterozygotyczna; Mutacja: p.Lys128Serfs*35, homozygotyczna

Obsługa

Culture Medium McCoys 5a, w: 3,0 g/l glukozy, w: stabilna glutamina, w: 2,0 mM pirogionianu sodu, w: 2,2 g/l NaHCO₃ (numer artykułu Cytion 820200a)**Supplements** Uzuppełnić podłoże 10% FBS**Dissociation Reagent** Accutase

Komórki HCT116-Luc | 305787**Seeding
density** $1-3 \times 10^4/\text{cm}^2$ **Freeze
medium**

Jako pożywki do kriokonserwacji używamy kompletnej pożywki wzrostowej (w tym FBS) + 10% DMSO w celu zapewnienia odpowiedniej żywotności po rozmrożeniu lub CM-1 (numer katalogowy Cytion 800100), która zawiera zoptymalizowane osmoprotektanty i stabilizatory metaboliczne w celu zwiększenia regeneracji i zmniejszenia stresu wywołanego kriokonserwacją.

**Thawing and
Culturing Cells**

1. Upewnij się, że fiolka pozostaje głęboko zamrożona w momencie dostawy, ponieważ komórki są wysyłane w suchym lodzie, aby utrzymać optymalną temperaturę podczas transportu.
2. Po otrzymaniu należy natychmiast przechowywać fiolkę w temperaturze poniżej -150°C , aby zapewnić zachowanie integralności komórek, lub przejść do kroku 3, jeśli wymagana jest natychmiastowa hodowla.
3. W przypadku natychmiastowej hodowli należy szybko rozmrozić fiolkę, zanurzając ją w łaźni wodnej o temperaturze 37°C z czystą wodą i środkiem przeciwdrobnoustrojowym, delikatnie mieszając przez 40-60 sekund, aż pozostanie niewielka grudka lodu.
4. Wykonaj wszystkie kolejne kroki w sterylnych warunkach w kapturze przepływowej, dezynfekując fiolkę 70% etanolem przed otwarciem.
5. Ostrożnie otworzyć zdezynfekowaną fiolkę i przenieść zawiesinę komórek do 15 ml probówki wirówkowej zawierającej 8 ml podłoża hodowlanego o temperaturze pokojowej, delikatnie mieszając.
6. Wirować mieszaninę z prędkością $300 \times g$ przez 3 minuty w celu oddzielenia komórek i ostrożnie odrzucić supernatant zawierający pozostałości pożywki do zamrażania.
7. Delikatnie ponownie zawiesić osad komórek w 10 ml świeżego podłoża hodowlanego. W przypadku komórek przylegających, rozdzielić zawiesinę pomiędzy dwie kolby hodowlane T25; w przypadku hodowli zawiesinowych, przenieść całą pożywkę do jednej kolby T25 w celu promowania skutecznej interakcji i wzrostu komórek.
8. Przestrzegaj ustalonych protokołów podhodowli w celu ciągłego wzrostu i utrzymania linii komórkowej, zapewniając wiarygodne wyniki eksperymentów.

**Incubation
Atmosphere** 37°C , 5% CO_2 , nawilżona atmosfera.

Komórki HCT116-Luc | 305787

Shipping Conditions

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiołki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Storage Conditions

W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiołki w ciekłym azocie w fazie lotnej w temperaturze od -150 do -196 °C. Przechowywanie w temperaturze -80 °C jest dopuszczalne tylko jako krótki etap przejściowy przed przeniesieniem do ciekłego azotu.

Kontrola jakości i analiza molekularna

Sterility

Zanieczyszczenie mykoplazmą jest wykluczane przy użyciu zarówno testów opartych na PCR, jak i metod wykrywania mykoplazmy opartych na luminescencji.

Aby upewnić się, że nie ma zanieczyszczenia bakteriami, grzybami lub drożdżami, hodowle komórkowe są poddawane codziennym kontrolom wizualnym.