

Komórki NCI-H1299-RFP | 300272

Informacje ogólne

Description

Komórki NCI-H1299 RFP, zmodyfikowane tak, aby zawierały reporter w genie DAPK1, są nie tylko przydatne do badania aktywacji określonych genów, ale także zapewniają szersze zrozumienie tego, jak komórki reagują globalnie na leki epigenetyczne. Korzystając z techniki zwanej Cap Analysis of Gene Expression (CAGE), naukowcy byli w stanie szczegółowo określić zmiany w miejscu rozpoczęcia transkrypcji w całym genomie w odpowiedzi na leczenie DNMTi (DAC), HDACi (SAHA lub SB939) lub ich kombinacjami. Metoda ta ujawnia nie tylko oczekiwaną reaktywację genu DAPK1, ale także pojawienie się nowych miejsc startu transkrypcji, zwanych indukowanymi leczeniem nieanotowanymi TSS (TINAT), szczególnie pod wpływem leczenia farmakologicznego. Te nowe miejsca startu są zwykle zlokalizowane w regionach genomu, które zwykle nie wytwarzają białek i prowadzą do tworzenia nowych cząsteczek RNA, które mogą potencjalnie kodować białka.

Dalsza analiza pokazuje, że te nowe cząsteczki RNA mogą czasami łączyć się z istniejącymi, tworząc tak zwane transkrypty fuzyjne TINAT-exon. W zależności od tego, w jaki sposób te transkrypty są łączone, mogą one przekładać się na nowe, nietypowe białka. Proces ten został potwierdzony za pomocą technik laboratoryjnych, które wykazały, że transkrypty te mogą rzeczywiście prowadzić do produkcji nowych form białek. Białka te mogą wchodzić w nieprawidłowe interakcje w komórce lub być rozpoznawane jako obce przez układ odpornościowy, potencjalnie oferując nowe cele dla terapii przeciwnowotworowej.

Aktywacja tych TINAT wiąże się ze skomplikowanymi zmianami zarówno w metylacji DNA, jak i modyfikacjach histonów, co ilustruje złożoną interakcję między tymi czynnikami epigenetycznymi pod wpływem leczenia farmakologicznego. W szczególności, połączone stosowanie DAC i SB939 wykazuje większy efekt, zwiększając ekspresję tych nowych transkryptów bardziej niż w przypadku stosowania każdego z leków osobno. Zrozumienie tych interakcji i ich wyników pomaga wyjaśnić, w jaki sposób terapie epigenetyczne zmieniają zachowanie komórek i otwiera możliwości nowych metod leczenia raka, które wykorzystują te złożone zmiany molekularne.

Organism

Człowiek

Tissue

Płuco

Disease

Rak wielkomórkowy

Metastatic site

Miejsce występowania guza pierwotnego (płuco)

Applications

Badania nad terapią epigenetyczną; reaktywacja genu DAPK1; badania nad odpowiedzią na leki z grupy DNMTi i HDACi; nieopisane miejsca rozpoczęcia transkrypcji (TINAT) wywołane leczeniem; transkryptomika metodą CAGE; analiza transkryptów fuzyjnych; produkcja nietypowych białek z ukrytych promotorów; badania przesiewowe nad kombinacjami leków epigenetycznych

Charakterystyka

Morphology

Podobny do nabłonka

Cell type

Komórki nabłonkowe

Komórki NCI-H1299-RFP | 300272

Growth properties

Adherent

Dane regulacyjne

Citation

NCI-H1299-EGFP, z opornością na G418 i wyciszonym reporterem (DKFZ nr P-1045) (numer katalogowy Cytion 300272)

Biosafety level

1

NCBI_TaxID

9606

CellosaurusAccession

CVCL_XB25

GMO Status

GMO-S1: Ta pochodna linii NCI-H1299 (DKFZ #P-1045) zawiera stabilnie wyciszony reporter EGFP w locus DAPK1, co umożliwia odczyt epigenetycznej reaktywacji. Obecna jest kasetka oporności na G418. Niniejsza klasyfikacja obowiązuje wyłącznie na terenie Niemiec i może różnić się w innych krajach.

Dane biomolekularne

Obsługa

Culture Medium

RPMI 1640, w: 2,0 mM stabilnej glutaminy, w: 2,0 g/L NaHCO₃ (numer artykułu Cytion 820700a)

Supplements

Uzupełnić podłoże 10% FBS

Dissociation Reagent

Accutase

Doubling time

ok. 24–36 godzin

Subculturing

Usuń starą pożywkę z przylegających komórek i przemyj je PBS, który nie zawiera wapnia i magnezu. W przypadku kolb T25 należy użyć 3-5 ml PBS, a w przypadku kolb T75 5-10 ml. Następnie całkowicie pokryj komórki Accutase, używając 1-2 ml dla kolb T25 i 2,5 ml dla kolb T75. Pozwól komórkom inkubować w temperaturze pokojowej przez 8-10 minut, aby je oddzielić. Po inkubacji delikatnie wymieszaj komórki z 10 ml pożywki, aby ponownie je zawiesić, a następnie odwiruj przy 300xg przez 3 minuty. Odrzuć supernatant, ponownie zawiesić komórki w świeżej pożywce i przenieść je do nowych kolb zawierających już świeżą pożywkę.

Split ratio

od 1 do 5

Komórki NCI-H1299-RFP | 300272

Seeding density od 1 do 3×10^4 komórek/cm²

Fluid renewal 2 do 3 razy w tygodniu

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 x 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% CO₂, nawilżona atmosfera.

Flask Coating Brak

Komórki NCI-H1299-RFP | 300272

Freezing Procedure

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.

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.

Profil STR

Amelogenin: x,y

PEZ6: LCLC-97TM1