

Komórki HaCaT-ras II-4 | 300495**Informacje ogólne****Description**

Komórki HaCaT-ras II-4 są niezwykle i szeroko badanym modelem komórkowym w naukach biologicznych. Komórki te pochodzą ze spontanicznie unieśmiertelnionych ludzkich keratynocytów skóry, znanych jako komórki HaCaT, które zostały zmodyfikowane poprzez transfekcję onkogenem c-Ha-ras (EJ). Selekcja tych komórek opierała się na ich oporności na G418, selektywny antybiotyk, jak opisano w kompleksowym badaniu przeprowadzonym przez Boukampa i wsp. w 1990 roku.

Jedną z godnych uwagi cech komórek HaCaT-ras II-4 jest ich nowotworowy charakter. Kiedy te klonalne komórki są wstrzykiwane myszom Balb/c-nu/nu, wykazują fascynujące zachowanie, tworząc wysoce zróżnicowane i miejscowo inwazyjne raki płaskonabłonkowe. Ta unikalna właściwość pozwala naukowcom badać mechanizmy rozwoju i progresji nowotworów w kontrolowanym środowisku eksperymentalnym.

Komórki HaCaT-ras II-4 pochodzą głównie z populacji rasy kaukaskiej, co zapewnia znaczenie dla określonej grupy etnicznej w badaniach naukowych. Ich pochodzenie i charakterystyka sprawiają, że są one nieocenionym źródłem informacji dla naukowców zainteresowanych badaniem różnych aspektów biologii i różnicowania skóry.

Komórki te posiadają częściowo lub w pełni zróżnicowany fenotyp w typowych warunkach hodowli. Fenotyp ten przypisuje się obfitej obecności wapnia zarówno w tradycyjnych pożywkach, jak i płodowej surowicy bydlęcej, która zapewnia idealne środowisko dla komórek wykazujących cechy przypominające dojrzałe komórki skóry. Ta cecha pozwala naukowcom badać skomplikowane procesy związane z rozwojem skóry, gojeniem się ran i różnicowaniem naskórka.

Dzięki swojej nowotworowej naturze i zdolności do replikowania biologii skóry in vitro, komórki HaCaT-ras II-4 oferują wyjątkową okazję do zbadania szlaków molekularnych związanych z rakiem skóry i innymi zaburzeniami związanymi ze skórą. Wykorzystując ten wyjątkowy model komórkowy, naukowcy mogą uzyskać głębszy wgląd w podstawowe mechanizmy nowotworzenia, potencjał inwazyjny i interwencje terapeutyczne.

Komórki HaCaT-ras II-4 są istotnym narzędziem do badań biologicznych, w szczególności w biologii skóry i badaniach różnicowania. Ich pochodzenie ze spontanicznie unieśmiertelnionych ludzkich keratynocytów skóry, modyfikacja onkogenem c-Ha-ras (EJ) i późniejsze zachowanie nowotworowe u myszy sprawiają, że są one nieocenione w badaniu chorób związanych ze skórą i podejść terapeutycznych. Wykorzystując unikalne cechy komórek HaCaT-ras II-4, naukowcy mogą lepiej zrozumieć biologię skóry i przyczynić się do rozwoju wiedzy medycznej i możliwości leczenia różnych chorób skóry.

Organism Człowiek**Tissue** Skóra**Synonyms** Klon HaCaT-ras II-4, HaCaT II-4, II-4**Charakterystyka****Age** 62 lata**Gender** Mężczyzna

Komórki HaCaT-ras II-4 | 300495**Ethnicity** Kaukaski**Cell type** Keratynocyt**Growth properties** Adherent**Dane regulacyjne****Citation** HaCaT-ras II-4 (numer katalogowy Cytion 300495)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_3868**Depositor** DKFZ, Heidelberg

GMO Status GMO-S1: Ta ludzka linia keratynocytów (HaCaT-ras II-4) zawiera plazmid kodujący sekwencje onkogenu c-Ha-Ras wprowadzony przez transfekcję, umożliwiając transformowany wzrost. Konstrukt jest zintegrowany z keratynocytami pochodzącymi z HaCaT. Ta klasyfikacja ma zastosowanie tylko w Niemczech i może różnić się w innych krajach.

Dane biomolekularne**Protein expression** P53 (+), CEA (+),

Tumorigenic Powstawanie wysoko zróżnicowanego, miejscowo inwazyjnego raka płaskonabłonkowego u myszy Balb/c-nu/nu.

Karyotype Aneuploidalny (hipotetraploidalny)**Obsługa**

Culture Medium DMEM, w: 4,5 g/l glukozy, w: 4 mM L-glutaminy, w: 3,7 g/l NaHCO₃, w: 1,0 mM pirogronianu sodu (numer artykułu Cytion 820300a)

Supplements Uzupelnic podloze 10% FBS

Komórki HaCaT-ras II-4 | 300495

Dissociation Reagent

Mieszanka 1:1 EDTA (zapas: 0,05%) i trypsyny (zapas: 0,1%) musi być przygotowana za każdym razem przed odłączeniem komórek przy użyciu PBS bez Ca²⁺ i Mg²⁺, aby zapewnić fizjologiczną osmolarność. Nie zaleca się stosowania gotowych do użycia mieszanin trypsyny/EDTA, ponieważ może to prowadzić do zbrylania się komórek. Alternatywnie można użyć TrypLETM Express (Life Technologies) zamiast trypsyny/EDTA. Należy postępować zgodnie z protokołem producenta.

Subculturing

1. **Usuń starą pożywkę:** Usunąć starą pożywkę z kolb.
2. **Płukanie komórek:** Dodaj 3-5 ml PBS (bez wapnia i magnezu) do kolb T25 lub 5-10 ml do kolb T75, aby przemyć przylegające komórki.
3. **Dodać roztwór EDTA:** Całkowicie przykryj warstwę komórek świeżo przygotowanym 0,05% roztworem EDTA - użyj 1-2 ml dla kolb T25 i 2,5 ml dla kolb T75.
4. **Inkubacja:** Inkubować kolby w temperaturze 37 stopni Celsjusza przez 10 minut.
5. **Dodać roztwór trypsyny/EDTA:** Po inkubacji dodaj świeżo przygotowany roztwór trypsyny/EDTA (0,05% trypsyny, 0,025% EDTA) do kolb, upewniając się, że komórki są w pełni pokryte - użyj 1 ml dla kolb T25 i 2,5 ml dla kolb T75.
6. **Monitorowanie oderwania:** Obserwować komórki, które powinny oddzielić się w ciągu 1-2 minut.
7. **Zneutralizuj trypsynę:** Dodaj pożywkę zawierającą FBS, aby zatrzymać aktywność trypsyny.
8. **Przenieś komórki:** Przenieś zawiesinę komórek do nowych kolb wypełnionych świeżym podłożem hodowlanym.

Split ratio

Zalecany jest stosunek 1:5 do 1:10

Seeding density

1×10^4 komórek/cm²

Fluid renewal

2 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.

Komórki HaCaT-ras II-4 | 300495**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 zawieszonych, 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.

Flask Coating

Brak

**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 czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiolki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Komórki HaCaT-ras II-4 | 300495

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 / Profil genetyczny / HLA

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,x
CSF1PO: 9,11
D13S317: 10,12
D16S539: 9,12
D5S818: 12
D7S820: 9,11
TH01: 9.3
TPOX: 11,12
vWA: 16,17
D3S1358: 16
D21S11: 28,30.2
D18S51: 12
Penta E: 7,12
Penta D: 11,13
D8S1179: 14
FGA: 24