

komórki imWilms1 | 300412

Informacje ogólne

Description

Linia komórkowa Wilms1 została pierwotnie uzyskana z pierwotnego guza Wilmsa, uzyskanego od pacjenta, u którego zdiagnozowano duże obustronne guzy nerek, charakterystyczne dla guza Wilmsa (nephroblastoma). Ta linia komórkowa jest nosicielem homozygotycznej mutacji nonsensownej w genie WT1 (c.149 C>A, p.S50X), prowadzącej do produkcji skróconego, niefunkcjonalnego białka WT1. WT1 jest krytycznym genem w rozwoju nerek, a jego mutacja jest ściśle związana z patogenezą guza Wilmsa, szczególnie w guzach wykazujących różnicowanie zrębu. Komórki Wilmsa1 wykazują stabilny kariotyp bez znaczących nieprawidłowości chromosomalnych i charakteryzują się fenotypem mezenchymalnym, ekspresją wimentyny przy jednoczesnym braku markerów nabłonkowych, takich jak cytokeratyna. Linia wykazuje ograniczoną, ale znaczącą zdolność do różnicowania mezenchymalnego, w tym potencjał do różnicowania się w komórki mięśniopodobne w określonych warunkach, co czyni ją kluczowym modelem do badania molekularnych konsekwencji mutacji WT1.

Aby przezwyciężyć ograniczoną żywotność pierwotnych komórek Wilms1, utworzono linię komórkową imWilms1 poprzez wprowadzenie potrójnie zmutowanego antygenu SV40 large T (U19dl89-97tsA58) do oryginalnych komórek nowotworowych, ułatwiając ich unieśmiertelnienie. Modyfikacja ta pozwala komórkom imWilms1 proliferować w nieskończoność przy zachowaniu stabilności chromosomalnej, oferując tym samym niezawodny model do badań długoterminowych. Unieśmiertelnione komórki imWilms1 nadal wykazują tę samą mutację WT1 i zachowują cechy mezenchymalne macierzystej linii Wilms1.

Oprócz cech genetycznych i fenotypowych, linia komórkowa imWilms1 została szeroko przeanalizowana pod kątem aktywności szlaku sygnałowego. Badania proteomiczne ujawniły fosforylację i aktywację kilku receptorowych kinaz tyrozynowych (RTK), w tym EGFR, PDGFR β i AXL, z aktywacją szlaków sygnałowych MAPK. Konsekwentna aktywacja tych szlaków w komórkach imWilms1 podkreśla ich znaczenie dla badania ukierunkowanych strategii terapeutycznych w guzie Wilmsa. Ogólnie rzecz biorąc, imWilms1 służy jako solidny i długoterminowy model do badania mechanizmów molekularnych leżących u podstaw rozwoju i progresji guza Wilmsa, szczególnie tych napędzanych przez mutacje WT1 i nieprawidłowe szlaki sygnałowe.

Organism Człowiek

Tissue Nerka

Disease Guz Wilmsa

Synonyms IM-WT-1

Charakterystyka

Age 10 miesięcy

Gender Kobieta

Ethnicity Kaukaski

komórki imWilms1 | 300412**Morphology** Wrzecionowaty kształt**Cell type** Komórki Wilmsa**Growth properties** Adherent**Dane regulacyjne****Citation** imWilms1 (numer katalogowy Cytion 300412)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_A5SN**Depositor** B. Royer-Pokora**GMO Status** GMO-S1: Ta ludzka linia guza Wilmsa imWilms1 zawiera potrójnie zmutowaną kasetę antygenu SV40 T umożliwiającą warunkową immortalizację na potrzeby badań nad nefroblastomą. Ta klasyfikacja ma zastosowanie wyłącznie w Niemczech i może różnić się w innych krajach.**Dane biomolekularne****Mutational profile** Status mutacji WT1: homozygotyczny c. 149 C>A, p.S50x, LOH: 11p11-11pter, status mutacji CTNNB1: heterozygotyczny TCT>TTT, p.S45F**Obsługa****Culture Medium** Zestaw MSCGM (od Lonza)**Dissociation Reagent** Accutase**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. Odrzucić supernatant, ponownie zawiesić komórki w świeżej pożywce i przenieść je do nowych kolb zawierających już świeżą pożywkę.

komórki imWilms1 | 300412**Fluid renewal** 1 do 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.

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.**Flask Coating**

W celu zapewnienia optymalnego przylegania i żywotności po rozmrożeniu zalecamy stosowanie **kolb lub płytek pokrytych kolagenem**.

komórki imWilms1 | 300412

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 fiolki 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 fiolki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Storage Conditions

W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiolki 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 wykluczone 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: 10,12
D13S317: 11,13
D16S539: 11,14
D5S818: 12,13,14
D7S820: 9,14
TH01: 9.3
TPOX: 8,9
vWA: 14,19
D3S1358: 14,17,18
D21S11: 30,31
D18S51: 15,18
Penta E: 5,14
Penta D: 13
D8S1179: 12,14
FGA: 22,25

komórki imWilms1 | 300412

Allele HLA

A*: '03:01:01, '24:02:01

B*: '35:03:01, '38:01:01

C*: '12:03:01

DRB1*: '07:01:01, '14:54:01

DQA1*: '01:04:01, '02:01:01

DQB1*: '02:02:01, '05:03:01

DPB1*: '02:01:02G, '04:02:01G

E: '01:03:01, '01:03:02