

Celule NCI-H1299-RFP | 300272

Informații generale

Description

Celulele RFP NCI-H1299, modificate pentru a include un reporter în gena DAPK1, nu sunt utile doar pentru studierea activării genelor specifice, ci oferă și o înțelegere mai largă a modului în care celulele reacționează la medicamentele epigenetice la nivel global. Prin utilizarea unei tehnici denumite Cap Analysis of Gene Expression (CAGE), cercetătorii au reușit să detalieze modificările în ceea ce privește locul de pornire a transcripției în genom ca răspuns la tratamentele cu DNMTi (DAC), HDACi (SAHA sau SB939) sau combinațiile acestora. Această metodă relevă nu numai reactivarea așteptată a genei DAPK1, ci și apariția unor noi locuri de pornire a transcripției, denumite TSS-uri neanalizate induse de tratament (TINAT-uri), în special sub tratament medicamentos. Aceste noi locuri de început sunt localizate de obicei în regiuni ale genomului care de obicei nu produc proteine și conduc la crearea de noi molecule de ARN care ar putea codifica proteine.

Analizele ulterioare arată că aceste noi molecule de ARN pot fuziona uneori cu cele existente pentru a forma ceea ce se numește transcripție de fuziune TINAT-exon. În funcție de modul în care aceste transcripții sunt îmbinate, ele se pot traduce în proteine noi, atipice. Acest proces a fost confirmat prin tehnici de laborator care demonstrează că aceste transcripții pot duce într-adevăr la producerea de noi forme proteice. Aceste proteine ar putea interacționa anormal în interiorul celulei sau ar putea fi recunoscute ca străine de sistemul imunitar, oferind potențial noi ținte pentru terapia cancerului.

Activarea acestor TINAT-uri implică schimbări complexe atât în metilarea ADN-ului, cât și în modificările histonelor, ilustrând o interacțiune complexă între acești factori epigenetici sub tratament medicamentos. În special, utilizarea combinată a DAC și SB939 arată un efect mai mare, stimulând expresia acestor transcripții noi mai mult decât atunci când oricare dintre medicamente este utilizat singur. Înțelegerea acestor interacțiuni și a rezultatelor lor ajută la clarificarea modului în care terapiile epigenetice modifică comportamentul celular și deschide posibilități pentru noi tratamente împotriva cancerului care valorifică aceste modificări moleculare complexe.

Organism

Om

Tissue

Plămân

Disease

Carcinom cu celule mari

Metastatic site

Localizarea tumorii primare (plămân)

Applications

Cercetarea în domeniul terapiei epigenetice; reactivarea genei DAPK1; studii privind răspunsul la medicamentele DNMTi și HDACi; TSS-uri neanotate induse de tratament (TINAT); transcriptomică CAGE; analiza transcrierilor de fuziune; producția de proteine atipice din promotori criptici; screeningul combinațiilor de medicamente epigenetice

Caracteristici

Morphology

De tip epitelial

Cell type

Celule epiteliale

Celule NCI-H1299-RFP | 300272

Growth properties

Aderent

Date de reglementare

Citation

NCI-H1299-EGFP, cu rezistență la G418 și reporter silențiat (DKFZ # P-1045) (număr de catalog Cytion 300272)

Biosafety level

1

NCBI_TaxID

9606

CellosaurusAccession

CVCL_XB25

GMO Status

GMO-S1: Acest derivat al liniei NCI-H1299 (DKFZ #P-1045) conține un reporter EGFP cu expresie stabilă suprimată în locusul DAPK1, ceea ce permite determinarea reactivării epigenetice. Prezență a casetei de rezistență la G418. Această clasificare se aplică numai în Germania și poate diferi în alte țări.

Date biomoleculare

Manipulare

Culture Medium

RPMI 1640, cu: 2,0 mM glutamină stabilă, cu: 2,0 g/L NaHCO₃ (număr articol Cytion 820700a)

Supplements

Suplimentați mediul cu 10% FBS

Dissociation Reagent

Accutase

Doubling time

aproximativ 24–36 de ore

Subculturing

Îndepărtați mediul vechi de pe celulele aderente și spălați-le cu PBS care nu conține calciu și magneziu. Pentru flacoanele T25, se utilizează 3-5 ml de PBS, iar pentru flacoanele T75, 5-10 ml. Apoi, se acoperă celulele complet cu Accutase, folosind 1-2 ml pentru flacoanele T25 și 2,5 ml pentru flacoanele T75. Lăsați celulele la incubare la temperatura camerei timp de 8-10 minute pentru a le detașa. După incubare, amestecați ușor celulele cu 10 ml de mediu pentru a le resuspenda, apoi centrifugați la 300xg timp de 3 minute. Aruncați supernatantul, resuspendați celulele în mediu proaspăt și transferați-le în flacoane noi care conțin deja mediu proaspăt.

Split ratio

de la 1 la 5

Celule NCI-H1299-RFP | 300272

Seeding density 1 până la 3×10^4 celule/cm²

Fluid renewal de 2 până la 3 ori pe săptămână

Freeze medium Ca mediu de crioconservare, folosim mediu de creștere complet (inclusiv FBS) + 10% DMSO pentru o viabilitate adecvată după dezghețare sau CM-1 (număr de catalog Cytion 800100), care include osmoprotectanți optimizați și stabilizatori metabolici pentru a spori recuperarea și a reduce stresul indus de criogenie.

Thawing and Culturing Cells

1. Confirmați că flaconul rămâne profund înghețat la livrare, deoarece celulele sunt expediate pe gheață carbonică pentru a menține temperaturi optime în timpul transportului.
2. La primire, fie depozitați crioviola imediat la temperaturi sub -150 °C pentru a asigura păstrarea integrității celulare, fie treceți la etapa 3 dacă este necesară cultivarea imediată.
3. Pentru cultivarea imediată, dezghețați rapid flaconul prin scufundarea acestuia într-o baie de apă la 37 °C cu apă curată și un agent antimicrobian, agitându-l ușor timp de 40-60 de secunde până când rămâne o mică aglomerare de gheață.
4. Se efectuează toate etapele ulterioare în condiții sterile, într-o hotă cu flux, dezinfectând crioviola cu etanol 70% înainte de deschidere.
5. Se deschide cu grijă flaconul dezinfectat și se transferă suspensia celulară într-un tub de centrifugare de 15 ml care conține 8 ml de mediu de cultură la temperatura camerei, amestecând ușor.
6. Se centrifughează amestecul la 300 x g timp de 3 minute pentru a separa celulele și se aruncă cu grijă supernatantul care conține mediul de congelare rezidual.
7. Se resuspendă ușor peletul celular în 10 ml de mediu de cultură proaspăt. Pentru celulele aderente, împărțiți suspensia între două flacoane de cultură T25; pentru culturile în suspensie, transferați tot mediul într-un flacon T25 pentru a promova interacțiunea și creșterea celulară eficientă.
8. Respectați protocoalele de subcultură stabilite pentru creșterea și menținerea continuă a liniei celulare, asigurând rezultate experimentale fiabile.

Incubation Atmosphere 37°C, 5%_{CO2}, atmosferă umidificată.

Flask Coating Niciuna

Celule NCI-H1299-RFP | 300272

Freezing Procedure

Liniile celulare crioconservate sunt expediate pe gheață carbonică în ambalaje izolate, validate, cu suficient agent frigorific pentru a menține aproximativ -78 °C pe toată durata transportului. La primire, se inspectează imediat recipientul și se transferă fără întârziere fiolele în depozitul corespunzător.

Shipping Conditions

Liniile celulare crioconservate sunt expediate pe gheață carbonică în ambalaje izolate, validate, cu suficient agent frigorific pentru a menține aproximativ -78 °C pe toată durata transportului. La primire, se inspectează imediat recipientul și se transferă fără întârziere fiolele în depozitul corespunzător.

Storage Conditions

Pentru conservarea pe termen lung, flacoanele se plasează în azot lichid în fază de vapori la o temperatură cuprinsă între -150 și -196 °C. Păstrarea la -80 °C este acceptabilă doar ca o scurtă etapă intermediară înainte de transferul în azot lichid.

Controlul calității și analiza moleculară

Sterility

Contaminarea cu micoplasmă este exclusă utilizând atât teste bazate pe PCR, cât și metode de detectare a micoplasmei bazate pe luminescență.

Pentru a se asigura că nu există contaminare bacteriană, fungică sau de drojdie, culturile celulare sunt supuse unor inspecții vizuale zilnice.