

NCI-H1299-RFP-celler | 300272

Allmän information

Description

NCI-H1299 RFP-cellerna, som modifierats för att inkludera en reporter i DAPK1-genen, är inte bara användbara för att studera specifik genaktivering utan ger också en bredare förståelse för hur celler reagerar på epigenetiska läkemedel globalt. Genom att använda en teknik som kallas Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) har forskarna i detalj kunnat se förändringar i var transkriptionen startar i genomet som svar på behandlingar med DNMTi (DAC), HDACi (SAHA eller SB939) eller kombinationer av dessa. Denna metod avslöjar inte bara den förväntade reaktiveringen av DAPK1-genen utan också uppkomsten av nya startplatser för transkription, så kallade behandlingsinducerade icke-annoterade TSS (TINAT), särskilt under läkemedelsbehandling. Dessa nya startställen är vanligtvis belägna i regioner i arvsmassan som vanligtvis inte producerar proteiner och leder till att nya RNA-molekyler skapas som potentiellt kan koda för proteiner.

Ytterligare analys visar att dessa nya RNA-molekyler ibland kan smälta samman med befintliga RNA-molekyler och bilda så kallade TINAT-exon-fusionstranskript. Beroende på hur dessa transkript splitsas kan de översättas till nya, atypiska proteiner. Denna process har bekräftats genom laborietekniker som visar att dessa transkript verkligen kan leda till produktion av nya proteinformer. Dessa proteiner kan interagera på ett onormalt sätt i cellen eller uppfattas som främmande av immunsystemet, vilket kan leda till nya mål för cancerbehandling.

Aktiveringen av dessa TINATs innebär invecklade förändringar i både DNA-metylering och histonmodifieringar, vilket illustrerar ett komplext samspel mellan dessa epigenetiska faktorer under läkemedelsbehandling. Framför allt visar den kombinerade användningen av DAC och SB939 en större effekt och ökar uttrycket av dessa nya transkript mer än när något av läkemedlen används ensamt. Förståelsen av dessa interaktioner och deras resultat bidrar till att klargöra hur epigenetiska terapier förändrar cellbeteendet och öppnar möjligheter för nya cancerbehandlingar som utnyttjar dessa komplexa molekylära förändringar.

Organism Människan**Tissue** Lungan**Disease** Storcelligt karcinom**Metastatic site** Primärtumörens lokalisering (lunga)**Applications** Forskning om epigenetisk terapi; reaktivering av DAPK1-genen; studier av läkemedelsrespons på DNMTi- och HDACi-läkemedel; behandlingsinducerade icke-annoterade transkriptionsstartpunkter (TINAT); CAGE-transkriptomik; analys av fusionstranskript; atypisk proteinproduktion från kryptiska promotorer; screening av epigenetiska läkemedelskombinationer

Egenskaper

Morphology Epitelliknande**Cell type** Epiteliala celler

NCI-H1299-RFP-celler | 300272

Growth properties

Följsam

Lagstadgade uppgifter

Citation

NCI-H1299-EGFP, med G418-resistens och inaktiverad reporter (DKFZ # P-1045) (Cytion-katalognummer 300272)

Biosafety level

1

NCBI_TaxID

9606

CellosaurusAccession

CVCL_XB25

GMO Status

GMO-S1: Detta NCI-H1299-derivat (DKFZ #P-1045) innehåller en EGFP-reporter som är stabilt tystad i DAPK1-lokuset, vilket möjliggör avläsning av epigenetisk reaktivering. G418-resistenskasset förekommer. Denna klassificering gäller endast inom Tyskland och kan skilja sig åt i andra länder.

Biomolekylära data

Hantering

Culture Medium

RPMI 1640, med: 2,0 mM stabilt glutamin, med: 2,0 g/L NaHCO₃ (Cytion artikelnummer 820700a)

Supplements

Komplettera mediet med 10% FBS

Dissociation Reagent

Accutase

Doubling time

ca 24 till 36 timmar

Subculturing

Ta bort det gamla mediet från de adherenta cellerna och tvätta dem med PBS som saknar kalcium och magnesium. Använd 3-5 ml PBS för T25-kolvar och 5-10 ml för T75-kolvar. Täck sedan cellerna helt med Accutase, använd 1-2 ml för T25-kolvar och 2,5 ml för T75-kolvar. Låt cellerna inkubera i rumstemperatur i 8-10 minuter så att de lossnar. Efter inkubationen, blanda cellerna försiktigt med 10 ml medium för att resuspendera dem och centrifugera sedan vid 300xg i 3 minuter. Kassera supernatanten, resuspendera cellerna i färskt medium och överför dem till nya kolvar som redan innehåller färskt medium.

Split ratio

1 till 5

NCI-H1299-RFP-celler | 300272

Seeding density 1 till 3×10^4 celler/cm²

Fluid renewal 2 till 3 gånger per vecka

Freeze medium Som kryokonserveringsmedium använder vi komplett tillväxtmedium (inklusive FBS) + 10% DMSO för adekvat viabilitet efter upptining, eller CM-1 (Cytion katalognummer 800100), som innehåller optimerade osmoprotektanter och metaboliska stabilisatorer för att förbättra återhämtningen och minska kryoinducerad stress.

Thawing and Culturing Cells

1. Bekräfta att flaskan är djupfryst vid leverans, eftersom cellerna skickas på torris för att bibehålla optimala temperaturer under transporten.
2. Vid mottagandet ska du antingen förvara kryovialen omedelbart vid temperaturer under -150 °C för att säkerställa att cellernas integritet bevaras, eller gå vidare till steg 3 om omedelbar odling krävs.
3. Vid omedelbar odling ska injektionsflaskan snabbt tinas genom att den sänks ned i ett 37 °C vattenbad med rent vatten och ett antimikrobiellt medel och omrörs försiktigt i 40-60 sekunder tills en liten isklump återstår.
4. Utför alla efterföljande steg under sterila förhållanden i en flödesbänk och desinficera kryovialerna med 70 % etanol innan de öppnas.
5. Öppna försiktigt den desinficerade flaskan och överför cellsuspensionen till ett 15 ml centrifugrör som innehåller 8 ml rumstempererat odlingsmedium och blanda försiktigt.
6. Centrifugera blandningen vid 300 x g i 3 minuter för att separera cellerna och kassera försiktigt supernatanten som innehåller resterande frysmedium.
7. Resuspendera försiktigt cellpelleten i 10 ml färskt odlingsmedium. För adherenta celler, fördela suspensionen mellan två T25-kulturbelägg; för suspensionskulturer, överför allt medium till en T25-kolv för att främja effektiv cellinteraktion och tillväxt.
8. Följ fastställda subkulturprotokoll för fortsatt tillväxt och underhåll av cellinjen, vilket säkerställer tillförlitliga experimentella resultat.

Incubation Atmosphere 37°C, 5% CO₂, befuktad atmosfär.

Flask Coating Ingen

NCI-H1299-RFP-celler | 300272

Freezing Procedure

Kryopreserverade cellinjer skickas på torris i validerade, isolerade förpackningar med tillräckligt med kylmedel för att hålla cirka -78 °C under hela transporten. Vid mottagandet ska behållaren omedelbart inspekteras och flaskorna utan dröjsmål överföras till lämplig förvaring.

Shipping Conditions

Kryopreserverade cellinjer skickas på torris i validerade, isolerade förpackningar med tillräckligt med kylmedel för att hålla cirka -78 °C under hela transporten. Vid mottagandet ska behållaren omedelbart inspekteras och flaskorna utan dröjsmål överföras till lämplig förvaring.

Storage Conditions

För långtidsförvaring, placera flaskorna i flytande kväve i ångfas vid ca -150 till -196 °C. Förvaring vid -80 °C är acceptabelt endast som ett kort mellanliggande steg innan överföring till flytande kväve.

Kvalitetskontroll och molekyllär analys

Sterility

Mykoplasmakontaminering utesluts med hjälp av både PCR-baserade analyser och luminiscensbaserade metoder för mykoplasmadiagnostik.

För att säkerställa att det inte finns någon kontaminering av bakterier, svamp eller jäst utsätts cellkulturerna för dagliga visuella inspektioner.

STR-profil

Amelogenin: x,y
PEZ6: LCLC-97TM1