

HaCaT-ras A5-celler | 300494

Allmän information

Description

HaCaT-ras A5-celler är en spontant immortaliserad, icke-tumorigen mänsklig hudkeratinocytcellinje som är viktig för studier av interaktioner mellan tumörens mikromiljö och utvecklingen av hudcancer. Dessa celler, som härstammar från en 62-årig kaukasisk man, har genomgått klonal selektion och mutagenes, vilket i kombination med autokrin tillväxtfaktorreglering möjliggör bildandet av långsamt växande, högt differentierade godartade cystiska tumörer i Balb/c-nu/nu-möss. Detta gör dem till en värdefull modell för att undersöka den cellulära dynamiken och de molekylära mekanismerna för tumörutveckling in vivo.

HaCaT-ras A5-cellerna är särskilt användbara för att belysa de komplexa interaktionerna mellan tumörceller och omgivande stromaceller, inklusive fibroblaster, immunceller och endotelceller. Dessa interaktioner förmedlas genom utsöndring av olika signalmolekyler, t.ex. tillväxtfaktorer, cytokiner och proteaser, bland vilka interleukin-6 (IL-6) spelar en central roll. Det är känt att IL-6 blir dysreglerat i många cancertyper, främst genom överuttryck eller ihållande aktivering av transkriptionsfaktorn STAT3.

Forskning har visat att IL-6-stimulering av HaCaT-ras A5-celler signifikant ökar deras proliferaion via JAK/STAT-signalvägen, medan fibroblaster förblir opåverkade på grund av en mer potent hämning av SOCS3, en negativ regulator av denna signalväg. Denna differentierade respons har fångats upp i en matematisk modell som beskriver dynamiken hos STAT3 och SOCS3, vilket ger en djupare förståelse för cellspecifika signaleringskaskader.

IL-6 påverkar dessutom inte bara direkt HaCaT-ras A5-cellens proliferaion utan påverkar också indirekt cellmiljön genom aktivering av ett nätverk av tillväxtfaktorer som HGF, KGF, VEGF och IL-8. Genuttrycksanalys som omfattade över 16 000 gener visade att IL-6-stimulering uppreglerar 19 gener relaterade till interferonsignalvägen i både HaCaT-ras A5-celler och fibroblaster, vilket korrelerar med den observerade tillväxthämningen i fibroblaster.

Upptäckten av SerpinB4:s avgörande roll för proliferaionen av HaCaT-ras A5-celler, som bekräftades genom siRNA-knockdown-experiment, understryker den komplicerade regleringen av IL-6 i både tumör- och stromaceller. Denna omfattande förståelse av IL-6:s roller ökar potentialen för att utveckla riktade terapeutiska strategier som syftar till att modulera IL-6:s signalvägar i tumörens mikromiljö.

Sammantaget erbjuder HaCaT-ras A5-celler en robust modell för att utforska det komplexa samspelet i tumörens mikromiljö, vilket banar väg för nya angreppssätt inom cancerforskning och terapiutveckling.

Organism Människan

Tissue Hud

Synonyms HaCaT-ras klon A-5, HaCaT A-5, A-5, A5

Egenskaper

Age 62 år

Gender Man

HaCaT-ras A5-celler | 300494**Ethnicity** Kaukasisk**Cell type** Keratinocyt**Growth properties** Följsam**Lagstadgade uppgifter****Citation** HaCaT-ras A5 (Cytion katalognummer 300494)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_xK16**Depositor** DKFZ, Heidelberg**GMO Status** GMO-S1: Denna HaCaT-ras A5-linje innehåller en plasmidburen c-Ha-ras onkogenkonstruktion för forskning om epitelial transformation. Denna klassificering gäller endast i Tyskland och kan skilja sig åt på andra håll.**Biomolekylära data****Protein expression** P53 (+), CEA (+),**Tumorigenic** Bildning av godartade tumörer hos Balb/c-nu/nu-möss.**Karyotype** Aneuploid (hypotetraploid)**Hantering****Culture Medium** DMEM, w: 4,5 g/L glukos, w: 4 mM L-glutamin, w: 3,7 g/L NaHCO₃, w: 1,0 mM natriumpyruvat (Cytion artikelnummer 820300a)**Supplements** Komplettera mediet med 10% FBS

HaCaT-ras A5-celler | 300494

Dissociation Reagent

Blandningen 1:1 av EDTA (lager: 0,05%) och trypsin (lager: 0,1%) måste beredas varje gång innan cellerna tas loss med hjälp av PBS utan Ca²⁺ och Mg²⁺ för att ge en fysiologisk osmolaritet. Färdiga blandningar av trypsin/EDTA rekommenderas inte, eftersom det kan leda till cellklumpar. Som ett alternativ kan TrypLETM Express (Life Technologies) användas i stället för trypsin/EDTA. Tillverkarens protokoll bör följas.

Subculturing

1. **Kassera gammalt medium:** Ta bort det gamla mediet från kolvarna.
2. **Tvätta cellerna:** Tillsätt 3-5 ml PBS (utan kalcium och magnesium) till T25-kolvarna eller 5-10 ml till T75-kolvarna för att tvätta de vidhäftande cellerna.
3. **Tillsätt EDTA-lösning:** Täck cellagret helt med en nyberedd 0,05% EDTA-lösning - använd 1-2 ml för T25-kolvar och 2,5 ml för T75-kolvar.
4. **Inkubering:** Inkubera kolvarna vid 37 grader Celsius i 10 minuter.
5. **Tillsätt trypsin/EDTA-lösning:** Efter inkubationen, tillsätt en nyberedd trypsin/EDTA-lösning (0,05% trypsin, 0,025% EDTA) till kolvarna och se till att cellerna är helt täckta - använd 1 ml för T25-kolvar och 2,5 ml för T75-kolvar.
6. **Övervaka avlägsnandet:** Observera cellerna, som bör lossna inom 1-2 minuter.
7. **Neutralisera trypsin:** Tillsätt FBS-innehållande cellodlingsmedium för att stoppa trypsinaktiviteten.
8. **Överför celler:** Disperdera cellsuspensionen till nya kolvar som fyllts med färskt odlingsmedium.

Split ratio

Ett förhållande på 1:5 till 1:10 rekommenderas

Seeding density

1×10^4 celler/cm²

Fluid renewal

2 gånger per vecka

Freeze medium

Som kryokonservationsmedium 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.

HaCaT-ras A5-celler | 300494

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 $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 flödeshuv 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 $300 \times g$ 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-kulturkanter; 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

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , befuktad atmosfär.

Flask Coating

Ingen

Freezing Procedure

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

HaCaT-ras A5-celler | 300494

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 / Genetisk profil / HLA

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,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

HLA-alleler

A*: '31:01:02
B*: '40:01:02, '51:01:01
C*: '03:04:01, '15:02:01
DRB1*: '04:01:01, '15:01:01G
DQA1*: '01:02:01, '03:03:01
DQB1*: '03:01:01, '06:02:01
DPB1*: '03:01:01G, '04:01:01G
E: '01:03:01, '01:03:02