

Bunky NCI-H1299-RFP | 300272**Všeobecné informácie****Description**

Bunky NCI-H1299 RFP, modifikované tak, aby obsahovali reportér v géne DAPK1, sú užitočné nielen na štúdium aktivácie špecifických génov, ale umožňujú aj širšie pochopenie toho, ako bunky reagujú na epigenetické lieky v globálnom meradle. Pomocou techniky nazývanej Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) vedci dokázali podrobne popísať zmeny v mieste začiatku transkripcie v celom genóme v reakcii na liečbu DNMTi (DAC), HDACi (SAHA alebo SB939) alebo ich kombináciami. Táto metóda odhaľuje nielen očakávanú reaktiváciu génu DAPK1, ale aj vznik nových miest štartu transkripcie, nazývaných liečbou indukované neanotované TSS (TINAT), najmä pri liečbe liekmi. Tieto nové štartovacie miesta sa zvyčajne nachádzajú v oblastiach genómu, ktoré zvyčajne neprodukurujú proteíny, a vedú k vzniku nových molekúl RNA, ktoré by potenciálne mohli kódovať proteíny.

Ďalšia analýza ukazuje, že tieto nové molekuly RNA sa niekedy môžu spojiť s existujúcimi a vytvoriť takzvané fúzne transkripty TINAT-exon. V závislosti od toho, ako sú tieto transkripty spájané, sa môžu premeniť na nové, netypické proteíny. Tento proces bol potvrdený laboratórnymi technikami, ktoré dokazujú, že tieto transkripty môžu skutočne viesť k tvorbe nových foriem proteínov. Tieto proteíny môžu v bunke abnormálne interagovať alebo ich imunitný systém rozpoznať ako cudzie, čo môže ponúknuť nové ciele pre liečbu rakoviny.

Aktivácia týchto TINAT zahŕňa zložité zmeny v metylácii DNA aj v modifikáciách histónov, čo ilustruje komplexnú interakciu medzi týmito epigenetickými faktormi pri liečbe liekmi. Najmä kombinované použitie DAC a SB939 vykazuje väčší účinok a zvyšuje expresiu týchto nových transkriptov viac, ako keď sa použije jedno z týchto liečiv samostatne. Pochopenie týchto interakcií a ich výsledkov pomáha objasniť, ako epigenetické terapie menia správanie buniek, a otvára možnosti pre novú liečbu rakoviny, ktorá využíva tieto komplexné molekulárne zmeny.

Organism Ľudské**Tissue** Plúca**Disease** Velkobunkový karcinóm**Charakteristika****Morphology** Epitelu podobné**Growth properties** Adherent**Regulačné údaje****Citation** NCI-H1299-EGFP, s rezistenciou na G418 a potlačeným reportérom (DKFZ # P-1045) (katalógové číslo Cytion 300272)**Biosafety level** 1

Bunky NCI-H1299-RFP | 300272

NCBI_TaxID 9606

Biomolekulárne údaje**Spracovanie****Culture Medium** RPMI 1640, w: 2,0 mM stabilný glutamín, w: 2,0 g/L NaHCO₃ (číslo výrobu Cytion 820700a)**Supplements** Doplníte médium o 10 % FBS**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Odstráňte staré médium z adherovaných buniek a premyte ich PBS, ktorý neobsahuje vápnik a horčík. Pre banky T25 použite 3 - 5 ml PBS a pre banky T75 použite 5 - 10 ml. Potom bunky úplne pokryte Accutase, pričom použite 1 - 2 ml pre banky T25 a 2,5 ml pre banky T75. Nechajte bunky inkubovať pri izbovej teplote 8-10 minút, aby sa oddelili. Po inkubácii jemne premiešajte bunky s 10 ml média, aby boli znovu suspendované, a potom ich 3 minúty odstredujte pri 300xg. Supernatant zlikvidujte, bunky znovu rozmiešajte v čerstvom médiu a preneste ich do nových fliaš, ktoré už obsahujú čerstvé médium.**Fluid renewal** 2 až 3-krát týždenne**Freeze medium** Ako kryokonzervačné médium používame kompletne rastové médium (vrátane FBS) + 10 % DMSO na zabezpečenie primeranej životaschopnosti po rozmrazení alebo CM-1 (katalógové číslo 800100 spoločnosti Cytion), ktoré obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory na zlepšenie regenerácie a zníženie stresu spôsobeného kryom.

Bunky NCI-H1299-RFP | 300272

Thawing and Culturing Cells

1. Overte si, že injekčná liekovka zostane pri doručení hlboko zmrazená, pretože bunky sa prepravujú na suchom ľade, aby sa počas prepravy udržala optimálna teplota.
2. Po prijatí buď okamžite uskladnite kryovialku pri teplote nižšej ako -150 °C, aby ste zabezpečili zachovanie bunkovej integrity, alebo prejdite na krok 3, ak je potrebná okamžitá kultivácia.
3. V prípade okamžitej kultivácie injekčnú liekovku rýchlo rozmrazte ponorením do vodného kúpeľa s teplotou 37 °C s čistou vodou a antimikrobiálnym prostriedkom, pričom ju jemne miešajte 40 - 60 sekúnd, kým nezostane malý ľadový chumáč.
4. Všetky ďalšie kroky vykonajte v sterilných podmienkach v prietokovom digestore a pred otvorením kryovialku dezinfikujte 70 % etanolom.
5. Opatrne otvorte dezinfikovanú fľaštičku a preneste bunkovú suspenziu do 15 ml centrifugačnej skúmavky obsahujúcej 8 ml kultivačného média s izbovou teplotou a jemne premiešajte.
6. Zmes odstreďujte pri 300 x g počas 3 minút, aby sa bunky oddelili, a opatrne zlikvidujte supernatant obsahujúci zvyšky zmrazovacieho média.
7. Pelet buniek jemne resuspendujte v 10 ml čerstvého kultivačného média. V prípade adherentných buniek rozdeľte suspenziu medzi dve kultivačné banky T25; v prípade suspenzných kultúr preneste všetko médium do jednej banky T25, aby ste podporili účinnú interakciu a rast buniek.
8. Dodržiavajte zavedené subkultivačné protokoly na nepretržitý rast a udržiavanie bunkovej línie, čím sa zabezpečia spoľahlivé výsledky experimentov.

Incubation Atmosphere

37 °C, 5 % CO_2 , zvlhčená atmosféra.

Flask Coating

Žiadne

Freezing Procedure

Kryokonzervované bunkové línie sa prepravujú na suchom ľade v overených, izolovaných obaloch s dostatočným množstvom chladiva na udržanie teploty približne -78 °C počas celej prepravy. Po prijatí ihneď skontrolujte obal a bezodkladne premiestnite injekčné liekovky do vhodného skladu.

Shipping Conditions

Kryokonzervované bunkové línie sa prepravujú na suchom ľade v overených, izolovaných obaloch s dostatočným množstvom chladiva na udržanie teploty približne -78 °C počas celej prepravy. Po prijatí ihneď skontrolujte obal a bezodkladne premiestnite injekčné liekovky do vhodného skladu.

Bunky NCI-H1299-RFP | 300272

Storage Conditions

Na dlhodobé uchovávanie umiestnite injekčné liekovky do kvapalnej fázy dusíka v pare pri teplote približne -150 až -196 °C. Skladovanie pri teplote -80 °C je prijateľné len ako krátky prechodný krok pred presunom do tekutého dusíka.

Kontrola kvality / Genetický profil / HLA

Sterility

Kontaminácia mykoplazmami sa vylučuje pomocou testov založených na PCR a metód detekcie mykoplazmiem založených na luminiscencii.

Aby sa zabezpečilo, že nedošlo ku kontaminácii baktériami, hubami alebo kvasinkami, bunkové kultúry sa denne vizuálne kontrolujú.