

Bunky HaCaT-ras A5 | 300494**Všeobecné informácie****Description**

Bunky HaCaT-ras A5 sú spontánne immortalizované, nenádorové ľudské keratinocytové bunkové línie, ktoré sú užitočné pri štúdiu interakcií nádorového mikroprostredia a progresie karcinómu kože. Tieto bunky pochádzajúce od 62-ročného muža kaukazskej rasy prešli klonálnou selekciou a mutagenézou, ktoré spolu s autokrinnou reguláciou rastových faktorov umožňujú tvorbu pomaly rastúcich, vysoko diferencovaných benígnych cystických nádorov u myší Balb/c-nu/nu. To z nich robí cenný model na skúmanie bunkovej dynamiky a molekulárnych mechanizmov progresie nádorov in vivo.

Bunky HaCaT-ras A5 sú obzvlášť užitočné na objasnenie komplexných interakcií medzi nádorovými bunkami a okolitými stromálnymi bunkami vrátane fibroblastov, imunitných buniek a endotelových buniek. Tieto interakcie sú sprostredkované vylučovaním rôznych signálnych molekúl, ako sú rastové faktory, cytokíny a proteázy, medzi ktorými interleukín-6 (IL-6) zohráva kľúčovú úlohu. Je známe, že IL-6 je dysregulovaný v mnohých typoch rakoviny, predovšetkým prostredníctvom nadmernej expresie alebo trvalej aktivácie transkripčného faktora STAT3.

Výskum ukázal, že stimulácia buniek HaCaT-ras A5 pomocou IL-6 výrazne zvyšuje ich proliferáciu prostredníctvom signálnej dráhy JAK/STAT, zatiaľ čo fibroblasty zostávajú neovplyvnené vďaka silnejšej inhibícii SOCS3, negatívnym regulátorom tejto dráhy. Táto rozdielna reakcia bola zachytená v matematickom modeli opisujúcom dynamiku STAT3 a SOCS3, ktorý poskytuje hlbšie pochopenie bunkovo špecifických signalizačných kaskád.

Okrem toho IL-6 nielen priamo ovplyvňuje proliferáciu buniek HaCaT-ras A5, ale nepriamo ovplyvňuje aj bunkové prostredie prostredníctvom aktivácie siete rastových faktorov, ako sú HGF, KGF, VEGF a IL-8. Analýza génovej expresie zahŕňajúca viac ako 16 000 génov odhalila, že stimulácia IL-6 reguluje 19 génov súvisiacich so signálnou dráhou interferónu v bunkách HaCaT-ras A5 aj vo fibroblastoch, čo koreluje s pozorovanou inhibíciou rastu vo fibroblastoch.

Objavenie kľúčovej úlohy SerpinB4 v proliferácii buniek HaCaT-ras A5, potvrdené experimentmi s vyradením siRNA, zdôrazňuje zložitú reguláciu IL-6 v nádorových aj stromálnych bunkách. Toto komplexné pochopenie úloh IL-6 zvyšuje potenciál pre vývoj cielených terapeutických stratégií zameraných na moduláciu signálnych dráh IL-6 v nádorovom mikroprostredí.

Bunky HaCaT-ras A5 celkovo ponúkajú spoľahlivý model na skúmanie komplexnej interakcie v rámci nádorového mikroprostredia, čím otvárajú cestu k novým prístupom vo výskume a vývoji terapie rakoviny.

Organism Ľudské**Tissue** Koža**Synonyms** HaCaT-ras klon A-5, HaCaT A-5, A-5, A5**Charakteristika****Age** 62 rokov**Gender** Muži

Bunky HaCaT-ras A5 | 300494**Ethnicity** Kaukazský**Cell type** Keratinocyty**Growth properties** Adherent**Regulačné údaje****Citation** HaCaT-ras A5 (katalógové číslo Cytion 300494)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_xK16**GMO Status** GMO-S1: Táto línia HaCaT-ras A5 obsahuje plazmidový konštrukt onkogénu c-Ha-ras na výskum epitelialnej transformácie. Táto klasifikácia platí len v Nemecku a môže sa líšiť v iných krajinách.**Biomolekulárne údaje****Protein expression** P53 (+), CEA (+),**Tumorigenic** Tvorba benígnych nádorov u myší Balb/c-nu/nu.**Karyotype** Aneuploidné (hypotetraploidné)**Spracovanie****Culture Medium** DMEM, w: 4,5 g/l glukózy, w: 4 mM L-glutamínu, w: 3,7 g/l NaHCO₃, w: 1,0 mM pyruvátu sodného (číslo výrobku Cytion 820300a)**Supplements** Doplňte médium o 10 % FBS**Dissociation Reagent** Zmes EDTA (zásoba 0,05 %) a trypsínu (zásoba 0,1 %) v pomere 1:1 sa musí pripraviť vždy pred oddelením buniek pomocou PBS bez Ca²⁺ a Mg²⁺, aby sa zabezpečila fyziologická osmolarita. Neodporúča sa používať zmes trypsínu/EDTA pripravené na použitie, pretože môžu spôsobiť zhukovanie buniek. Ako alternatívu možno namiesto trypsínu/EDTA použiť TrypLETM Express (Life Technologies). Mal by sa dodržiavať protokol výrobcu.

Bunky HaCaT-ras A5 | 300494**Subculturing**

1. **Vyradenie starého média:** Odstráňte staré médium z banky.
2. **Premyte bunky:** Pridajte 3 - 5 ml PBS (bez vápnika a horčíka) do banky T25 alebo 5 - 10 ml do banky T75, aby ste premyli prilnuté bunky.
3. **Pridajte roztok EDTA:** Vrstvu buniek úplne pokryte čerstvo pripraveným 0,05 % roztokom EDTA - použite 1 - 2 ml pre banky T25 a 2,5 ml pre banky T75.
4. **Inkubácia:** Inkubujte banky pri teplote 37 °C počas 10 minút.
5. **Pridajte roztok trypsínu/EDTA:** Po inkubácii pridajte do baniek čerstvo pripravený roztok trypsínu/EDTA (0,05 % trypsin, 0,025 % EDTA), pričom sa uistite, že bunky sú úplne pokryté - použite 1 ml pre banky T25 a 2,5 ml pre banky T75.
6. **Monitorujte oddeľovanie:** Pozorujte bunky, ktoré by sa mali oddeliť do 1 - 2 minút.
7. **Neutralizujte trypsin:** Pridajte médium na kultiváciu buniek obsahujúce FBS, aby ste zastavili aktivitu trypsínu.
8. **Preneste bunky:** Bunková suspenzia sa preleje do nových fliaš vopred naplnených čerstvým kultivačným médiom.

Seeding density 1×10^4 buniek/cm²**Fluid renewal**

2 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 HaCaT-ras A5 | 300494**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 HaCaT-ras A5 | 300494

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.

Alely HLA

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