

bunky imWilms1 | 300412

Všeobecné informácie

Description

Bunková línia Wilms1 bola pôvodne odvodená z primárneho Wilmsovho nádoru získaného od pacienta s diagnózou veľkých bilaterálnych nádorov obličiek, čo je charakteristický prejav Wilmsovho nádoru (nefroblastómu). Táto bunková línia obsahuje homozygotnú nezmyselnú mutáciu v géne WT1 (c.149 C>A, p.S50X), ktorá vedie k produkcii skráteneho, nefunkčného proteínu WT1. WT1 je kritický gén vo vývoji obličiek a jeho mutácia je úzko spojená s patogenézou Wilmsovho nádoru, najmä v nádoroch vykazujúcich stromálnu diferenciaciu. Bunky Wilms1 vykazujú stabilný karyotyp bez významných chromozomálnych abnormalít a vyznačujú sa mezenchýmovým fenotypom, exprimujú vimentín, pričom im chýbajú epiteliálne markery, ako je cytokeratín. Táto línia vykazuje obmedzenú, ale významnú schopnosť mezenchýmovej diferencie vrátane potenciálu diferencovať sa na bunky podobné svalom za špecifických podmienok, čo z nej robí kľúčový model na štúdium molekulárnych dôsledkov mutácií WT1.

Na prekonanie obmedzenej životnosti primárnych buniek Wilms1 bola vytvorená bunková línia imWilms1 zavedením trojnásobne mutovaného veľkého antigénu SV40 T (U19dl89-97tsA58) do pôvodných nádorových buniek, čo ulahčilo ich immortalizáciu. Táto modifikácia umožňuje bunkám imWilms1 množiť sa neobmedzene dlho pri zachovaní chromozómovej stability, čím ponúka spoľahlivý model na dlhodobé štúdie. Immortalizované bunky imWilms1 naďalej vykazujú tú istú mutáciu WT1 a zachovávajú si mezenchýmové vlastnosti materskej línie Wilms1.

Okrem genetických a fenotypových vlastností bola bunková línia imWilms1 podrobne analyzovaná z hľadiska aktivity signálnych dráh. Proteomické štúdie odhalili fosforyláciu a aktiváciu niekoľkých receptorových tyrozínkináz (RTK) vrátane EGFR, PDGFR β a AXL s následnou aktiváciou signálnych dráh MAPK. Dôsledná aktivácia týchto dráh v bunkách imWilms1 zdôrazňuje ich význam pre skúmanie cielených terapeutických stratégií pri Wilmsovom nádore. Celkovo imWilms1 slúži ako robustný a dlhodobý model na skúmanie molekulárnych mechanizmov, ktoré sú základom vývoja a progresie Wilmsovho nádoru, najmä tých, ktoré sú spôsobené mutáciami WT1 a aberantnými signálnymi dráhami.

Organism	Ludské
Tissue	Obličky
Disease	Wilmsov nádor
Synonyms	IM-WT-1

Charakteristika

Age	10 mesiacov
Gender	Ženy
Ethnicity	Kaukazský

bunky imWilms1 | 300412**Morphology** Vreteno v tvare vretena**Cell type** Wilmsove bunky**Growth properties** Adherent**Regulačné údaje****Citation** imWilms1 (katalógové číslo Cytion 300412)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_A5SN**GMO Status** GMO-S1: Táto línia ľudského Wilmsovho nádoru imWilms1 obsahuje trojnásobne mutovanú kazetu SV40 T-antigénu, ktorá umožňuje podmienenú imortalizáciu na výskum nefroblastómu. Táto klasifikácia platí len v Nemecku a môže sa líšiť v iných krajinách.**Biomolekulárne údaje****Mutational profile** Stav mutácie WT1: homozygotná c. 149 C>A, p.S50x, LOH: 11p11-11pter, stav mutácie CTNNB1: heterozygotná TCT>TTT, p.S45F**Spracovanie****Culture Medium** Súprava MSCGM (od spoločnosti Lonza)**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** 1 až 2-krát týždenne

bunky imWilms1 | 300412

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.

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 $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 odstreďte pri $300 \times g$ 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

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , zvlhčená atmosféra.

Flask Coating

Na dosiahnutie optimálneho uchytenia a životaschopnosti po rozmrazení odporúčame používať **banky alebo platne s kolagénom**.

bunky imWilms1 | 300412

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.

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*: '03:01:01, '24:02:01
B*: '35:03:01, '38:01:01
C*: '12:03:01
DRB1*: '07:01:01, '14:54:01
DQA1*: '01:04:01, '02:01:01
DQB1*: '02:02:01, '05:03:01
DPB1*: '02:01:02G, '04:02:01G
E: '01:03:01, '01:03:02