

Bunky NCH644 | 300124**Všeobecné informácie****Description**

Bunková línia NCH644 je glioblastómová kmeňová bunková línia odvodená z nádorov pacientov, ktoré nemajú amplifikáciu EGFR, čo z nej robí cenný model na štúdium biológie glioblastómu, najmä v kontexte signalizácie rastových faktorov a vlastností kmeňových buniek. Štúdie preukázali, že v bunkách NCH644 zohráva základný fibroblastový rastový faktor (bFGF) významnú úlohu pri sprostredkovaní rastu a udržiavaní vlastností kmeňových buniek, zatiaľ čo epidermálny rastový faktor (EGF) podobné účinky nevykazuje. Bunky NCH644 reagujú na bFGF zvýšením expície markerov kmeňových buniek, ako sú CD133 a nestín, a vykazujú aj zvýšenú odolnosť voči apoptóze. Táto odolnosť spolu s chýbajúcou amplifikáciou EGFR robí z NCH644 vhodný model na pochopenie správania kmeňových buniek podobných glioblastómu, najmä za rôznych podmienok pôsobenia rastových faktorov.

Ďalšou pozoruhodnou vlastnosťou NCH644 je pomalšia miera proliferácie v porovnaní s inými glioblastómovými kmeňovými bunkovými líniami, ako je NCH421k. Pri stimulácii bFGF však bunky NCH644 vykazujú zvýšenú expíciu EGFR, a to aj pri absencii amplifikácie EGFR, čo poukazuje na interakciu medzi receptormi fibroblastového rastového faktora (FGFR) a signálnymi dráhami EGFR. Okrem toho bFGF zohráva úlohu pri zvyšovaní klonogenity a multipotencie buniek NCH644, čo ďalej podporuje názor, že bFGF je rozhodujúci pre udržanie kmeňových vlastností týchto buniek podobných gliómu.

Ukázalo sa tiež, že bunky NCH644 ukrývajú subpopulácie s pomalým cyklom, ktoré vykazujú zvýšenú nádorovú aktivitu a odolnosť voči liečbe, ako je ožarovanie a temozolomid. Táto subpopulácia buniek zachovávajúcich značku v rámci línie NCH644 je vysoko tumorigénna a je schopná vytvárať nádory u imunokompromitovaných myší aj pri malom počte buniek. Tieto vlastnosti spolu s ich odolnosťou voči štandardnej liečbe robia z NCH644 kritický nástroj na skúmanie terapeutických stratégií zameraných na kmeňové bunky glioblastómu.

Organism Ľudské**Tissue** Mozog**Disease** Glioblastóm**Charakteristika****Age** 66 rokov**Gender** Ženy**Ethnicity** Kaukazský**Growth properties** Sféroïdná kultúra**Regulačné údaje**

Bunky NCH644 | 300124**Citation** NCH644 (katalógové číslo Cytion 300124)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_x914**Biomolekulárne údaje****Antigen expression** Vysoko CD133 pozitívny**Tumorigenic** Áno**Ploidy status** Aneuploidné**Spracovanie****Culture Medium** DMEM:Ham's F12 (1:1), w: 3,1 g/l glukózy, w: 2,5 mM L-glutamínu, w: 15 mM HEPES, w: 0,5 mM pyruvátu sodného, w: 1,2 g/l NaHCO₃ (číslo výrobku Cytion 820400a)**Supplements** Doplňte médium o 10 % FBS, 5 mg/l heparínu, 20 ng/ml bFGF, 20 mikrogramov/l EGF, 5 mg/l inzulínu, 100 mg/l transferínu, 5,2 mikrogramu/l Na-selenitu, 6,3 mikrogramu/l progesterónu, 161,1 mikrogramu/l putrescínu, 50 mg/l hydrokortínu**Subculturing** Pri subkultivácii sféroidných kultúr začnite mechanickou disociáciou sféroidov pipetovaním hore a dole 5 až 10-krát pomocou pipety Eppendorf s 1000 µl filtračnými špičkami. Potom zmes odstreďujte pri 300 g počas 5 minút pri izbovej teplote, aby sa bunky peletizovali. Supernatant zlikvidujte a pelety buniek znovu rozpustíte v čerstvom kultivačnom médiu. Nakoniec preneste resuspendované bunky do nových kultivačných nádob, aby ste podporili ďalšiu tvorbu sféroidov. Tento postup zabezpečuje účinný rozpad sféroidov a pripravuje ich na ďalší rast v novom prostredí**Seeding density** 2×10^5 buniek/ml**Fluid renewal** 2 až 3-krát týždenne**Post-Thaw Recovery** Po rozmrazení nechajte bunky zotaviť sa z procesu zmrazovania aspoň 24 až 48 hodín.

Bunky NCH644 | 300124

Freeze medium

Ako kryokonzervačné médium používame 50 % bazálne médium + 40 % FBS + 10 % DMSO alebo CM-1 (katalógové číslo Cytion 800100), 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 odstreďujte 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**.

Freezing Procedure

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

Bunky NCH644 | 300124

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.