

Celice NCI-H1299-RFP | 300272

Splošne informacije

Description

Celice NCI-H1299 RFP, ki so bile spremenjene tako, da vključujejo poročevalce v genu DAPK1, niso uporabne le za preučevanje aktivacije določenega gena, temveč omogočajo tudi širše razumevanje, kako se celice globalno odzivajo na epigenetska zdravila. Z uporabo tehnike, imenovane Cap Analysis of Gene Expression (CAGE), so raziskovalci lahko podrobno opredelili spremembe v tem, kje se začne transkripcija po genomu kot odziv na zdravljenje z DNMTi (DAC), HDACi (SAHA ali SB939) ali njihovimi kombinacijami. Ta metoda ne razkriva le pričakovane reaktivacije gena DAPK1, temveč tudi pojav novih začetnih mest transkripcije, imenovanih z zdravljenjem povzročeni neanotirani TSS (TINAT), zlasti pri zdravljenju z zdravili. Ta nova začetna mesta se običajno nahajajo v predelih genoma, kjer se običajno ne proizvajajo beljakovine, in vodijo v nastanek novih molekul RNK, ki bi lahko potencialno kodirale beljakovine.

Nadaljnja analiza je pokazala, da se te nove molekule RNK včasih lahko združijo z obstoječimi in tvorijo tako imenovane fuzijske transkripte TINAT-exon. Odvisno od tega, kako so ti transkripti zlepljeni, se lahko pretvorijo v nove, netipične beljakovine. Ta proces je bil potrjen z laboratorijskimi tehnikami, ki dokazujejo, da lahko ti transkripti dejansko privedejo do nastanka novih oblik beljakovin. Te beljakovine lahko v celici delujejo nenormalno ali pa jih imunski sistem prepozna kot tuje, kar lahko ponudi nove tarče za zdravljenje raka.

Aktivacija teh TINAT vključuje zapletene spremembe metilacije DNK in modifikacij histonov, kar ponazarja zapleteno interakcijo med temi epigenetskimi dejavniki pri zdravljenju z zdravili. Zlasti kombinirana uporaba DAC in SB939 kaže večji učinek, saj poveča izražanje teh novih transkriptov bolj, kot če se uporabi samo eno od zdravil. Razumevanje teh interakcij in njihovih rezultatov pomaga pojasniti, kako epigenetske terapije spreminjajo obnašanje celic, in odpira možnosti za nova zdravljenja raka, ki bi izkoristila te zapletene molekularne spremembe.

Organism

Človek

Tissue

Pljuča

Disease

Velikocelični karcinom

Metastatic site

Mesto primarnega tumorja (pljuča)

Applications

Raziskave na področju epigenetske terapije; ponovna aktivacija gena DAPK1; študije odziva na zdravila DNMTi in HDACi; z zdravljenjem povzročeni neoznačeni začetki transkripcije (TINAT); transkriptomika CAGE; analiza fuzijskih transkriptov; nastajanje atipičnih beljakovin iz skritih promotorjev; presejanje kombinacij epigenetskih zdravil

Značilnosti

Morphology

Epitelijam podobni

Cell type

Epitelijske celice

Celice NCI-H1299-RFP | 300272

Growth properties

Pripadajoče

Regulativni podatki

Citation

NCI-H1299-EGFP, z odpornostjo proti G418 in utišanim poročevalcem (DKFZ št. P-1045) (katalogska številka Cytion 300272)

Biosafety level

1

NCBI_TaxID

9606

CellosaurusAccession

CVCL_XB25

GMO Status

GMO-S1: Ta derivat linije NCI-H1299 (DKFZ #P-1045) vsebuje stabilno utišan EGFP-reporter v lokusu DAPK1, kar omogoča odčitavanje epigenetske reaktivacije. Vsebuje kaseto za odpornost proti G418. Ta klasifikacija velja le v Nemčiji in se lahko drugod razlikuje.

Biomolekularni podatki

Ravnanje s spletno stranjo

Culture Medium

RPMI 1640, w: 2,0 mM stabilnega glutamina, w: 2,0 g/L NaHCO₃ (številka izdelka Cytion 820700a)

Supplements

Gojišče dopolnite z 10 % FBS

Dissociation Reagent

Accutase

Doubling time

približno 24 do 36 ur

Subculturing

Odstranite staro gojišče z adherentnih celic in jih sperite s PBS, ki ne vsebuje kalcija in magnezija. Za bučke T25 uporabite 3-5 ml PBS, za bučke T75 pa 5-10 ml. Nato celice popolnoma prekrijte z Accutase, pri čemer uporabite 1-2 ml za bučke T25 in 2,5 ml za bučke T75. Celice pustite inkubirati pri sobni temperaturi 8-10 minut, da se ločijo. Po inkubaciji celice nežno premešajte z 10 ml gojišča, da se ponovno suspendirajo, nato jih 3 minute centrifugirajte pri 300xg. Zavržite supernatant, ponovno suspendirajte celice v svežem gojišču in jih prenesite v nove bučke, ki že vsebujejo sveže gojišče.

Split ratio

1 do 5

Celice NCI-H1299-RFP | 300272

Seeding density 1 do 3×10^4 celic/cm²

Fluid renewal 2 do 3-krat na teden

Freeze medium Kot gojišče za kriokonzervacijo uporabljamo popolno rastno gojišče (vključno s FBS) + 10 % DMSO za ustrezno vitalnost po odmrznitvi ali CM-1 (kataloška številka 800100 podjetja Cytion), ki vključuje optimizirane osmoprotektante in presnovne stabilizatorje za izboljšanje okrevanja in zmanjšanje stresa, povzročenega s kriom.

Thawing and Culturing Cells

1. Prepričajte se, da je viala ob dostavi globoko zamrznjena, saj se celice pošiljajo na suhem ledu, da se med prevozom ohranijo optimalne temperature.
2. Po prejemu kriovial takoj shranite pri temperaturi pod -150 °C, da zagotovite ohranitev celične celovitosti, ali pa nadaljujte s korakom 3, če je potrebno takojšnje gojenje.
3. Za takojšnje gojenje vialo hitro odtalite tako, da jo potopite v vodno kopel s čisto vodo in protimikrobnim sredstvom pri 37 °C ter 40-60 sekund nežno mešate, dokler ne ostane majhen ledeni kepica.
4. Vse nadaljnje korake izvajajte v sterilnih pogojih v pretočni nape, pred odprtjem pa kriovial razkužite s 70 % etanolom.
5. Previdno odprite razkuženo vialo in celično suspenzijo prenesite v 15-mililitrsko centrifugirno epruveto, ki vsebuje 8 ml gojišča sobne temperature, ter nežno premešajte.
6. Mešanico centrifugirajte pri 300 x g 3 minute, da ločite celice, in previdno zavržite supernatant, ki vsebuje ostanke zamrzovalnega gojišča.
7. Pelet celic nežno ponovno suspendirajte v 10 ml svežega gojišča. Pri adherentnih celicah suspenzijo razdelite med dve bučki T25; pri suspenzijskih kulturah prenesite vse gojišče v eno bučko T25, da spodbudite učinkovito interakcijo in rast celic.
8. Upoštevajte uveljavljene protokole subkultur za nadaljnjo rast in vzdrževanje celične linije ter tako zagotovite zanesljive rezultate poskusov.

Incubation Atmosphere 37 °C, 5 % CO₂, vlažno ozračje.

Flask Coating Nič

Celice NCI-H1299-RFP | 300272

Freezing Procedure

Kriokonzervirane celične linije se pošiljajo na suhem ledu v potrjeni, izolirani embalaži z zadostno količino hladilnega sredstva, da se med prevozom vzdržuje približno -78°C . Ob prejemu takoj preglejte embalažo in vialo nemudoma prenesite v ustrezno skladišče.

Shipping Conditions

Kriokonzervirane celične linije se pošiljajo na suhem ledu v potrjeni, izolirani embalaži z zadostno količino hladilnega sredstva, da se med prevozom vzdržuje približno -78°C . Ob prejemu takoj preglejte embalažo in vialo nemudoma prenesite v ustrezno skladišče.

Storage Conditions

Za dolgotrajno shranjevanje vialo postavite v tekoči dušik v parni fazi pri približno -150 do -196°C . Shranjevanje pri -80°C je sprejemljivo le kot kratek vmesni korak pred prenosom v tekoči dušik.

Kontrola kakovosti in molekularna analiza

Sterility

Kontaminacija z mikoplazmo se izključi z uporabo testov na podlagi PCR in metod za odkrivanje mikoplazme na podlagi luminiscence.

Da se zagotovi, da ni kontaminacije z bakterijami, glivami ali kvasovkami, se celične kulture dnevno vizualno pregledujejo.