

Celice HaCaT-ras II-4 | 300495**Splošne informacije****Description**

Celice HaCaT-ras II-4 so izjemen in obsežno preučevan celični model v biološki znanosti. Te celice izhajajo iz spontano immortaliziranih keratinocitov človeške kože, znanih kot celice HaCaT, ki so bile spremenjene s transfekcijo z onkogenom c-Ha-ras (EJ). Izbira teh celic je temeljila na njihovi odpornosti na selektivni antibiotik G418, kot je opisano v obsežni študiji, ki jo je leta 1990 izvedel Boukamp et al.

Pomembna značilnost celic HaCaT-ras II-4 je njihova tumorigena narava. Ko se te klonske celice injicirajo v miši Balb/c-nu/nu, se obnašajo fascinantno, saj tvorijo visoko diferencirane in lokalno invazivne ploščatocelične karcinome. Ta edinstvena lastnost raziskovalcem omogoča raziskovanje mehanizmov razvoja in napredovanja tumorjev v nadzorovanem eksperimentalnem okolju.

Celice HaCaT-ras II-4 večinoma izvirajo iz kavkaške populacije, kar zagotavlja ustreznost za določeno etnično skupino v znanstvenih raziskavah. Zaradi svojega izvora in značilnosti so neprecenljiv vir za raziskovalce, ki se zanimajo za preučevanje različnih vidikov biologije in diferenciacije kože.

Te celice imajo delno do popolnoma diferenciran fenotip v tipičnih pogojih gojenja. Ta fenotip je posledica velike prisotnosti kalcija v tradicionalnih gojiščih in fetalnem govejem serumu, kar celicam zagotavlja idealno okolje, v katerem kažejo lastnosti, podobne lastnostim zrelih kožnih celic. Ta lastnost raziskovalcem omogoča raziskovanje zapletenih procesov, povezanih z razvojem kože, celjenjem ran in diferenciacijo epidermisa.

S svojo tumorigeno naravo in zmožnostjo repliciranja kožne biologije in vitro so celice HaCaT-ras II-4 edinstvena priložnost za raziskovanje molekularnih poti, povezanih s kožnim rakom in drugimi s kožo povezanimi motnjami. Z uporabo tega izjemnega celičnega modela lahko raziskovalci pridobijo globlji vpogled v osnovne mehanizme tumorigeneze, invazivni potencial in terapevtske posege.

Celice HaCaT-ras II-4 so pomembno orodje za raziskave v bioloških znanostih, zlasti v študijah biologije kože in diferenciacije. Izvirajo iz spontano immortaliziranih človeških kožnih keratinocitov, so modificirane z onkogenom c-Ha-ras (EJ) in se nato tumorsko obnašajo pri miših, zato so neprecenljive za raziskovanje bolezni, povezanih s kožo, in terapevtskih pristopov. Z izkoriščanjem edinstvenih lastnosti celic HaCaT-ras II-4 lahko raziskovalci bolje razumejo biologijo kože ter prispevajo k razvoju medicinskega znanja in možnosti zdravljenja različnih kožnih bolezni.

Organism Človek**Tissue** Koža**Synonyms** Klon HaCaT-ras II-4, HaCaT II-4, II-4**Značilnosti****Age** 62 let**Gender** Moški**Ethnicity** Kavkaški

Celice HaCaT-ras II-4 | 300495**Cell type** Keratinociti**Growth properties** Pripadajoče**Regulativni podatki****Citation** HaCaT-ras II-4 (katalogska številka Cytion 300495)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_3868**GMO Status** GSO-S1: Ta linija človeških keratinocitov (HaCaT-ras II-4) vsebuje plazmid, ki kodira zaporedje onkogenega c-Ha-Ras, vneseno s transfekcijo, kar omogoča preoblikovano rast. Konstrukt je integriran v keratinocite HaCaT. Ta razvrstitev velja samo v Nemčiji in se lahko drugje razlikuje.**Biomolekularni podatki****Protein expression** P53 (+), CEA (+),**Tumorigenic** Nastanek visoko diferenciranega, lokalno invazivnega ploščatoceličnega karcinoma pri miših Balb/c-nu/nu.**Karyotype** Aneuploidni (hipotraploidni)**Ravnanje s spletno stranjo****Culture Medium** DMEM, w: 4,5 g/L glukoze, w: 4 mM L-glutamina, w: 3,7 g/L NaHCO₃, w: 1,0 mM natrijevega piruvata (številka izdelka Cytion 820300a)**Supplements** Gojišče dopolnite z 10 % FBS**Dissociation Reagent** Mešanico EDTA (zaloga: 0,05 %) in tripsina (zaloga: 0,1 %) v razmerju 1:1 je treba pripraviti vsakič pred ločitvijo celic z uporabo PBS brez Ca²⁺ in Mg²⁺, da se zagotovi fiziološka osmolarnost. Pripravljene mešanice tripsina/EDTA niso priporočljive, saj lahko pride do zlepljanja celic. Namesto tega lahko namesto tripsina/EDTA uporabimo TrypLETM Express (Life Technologies). Upoštevati je treba protokol proizvajalca.

Celice HaCaT-ras II-4 | 300495

Subculturing

1. **Zavržite star medij:** Odstranite staro gojišče iz bučk.
2. **Izperite celice:** V bučke T25 dodajte 3-5 ml PBS (brez kalcija in magnezija), v bučke T75 pa 5-10 ml, da sperete prilepljene celice.
3. **Dodajte raztopino EDTA:** Plast celic popolnoma prekrijte s sveže pripravljeno 0,05 % raztopino EDTA - uporabite 1-2 ml za bučke T25 in 2,5 ml za bučke T75.
4. **Inkubacija:** Bučke inkubirajte 10 minut pri 37 stopinjah Celzija.
5. **Dodajte raztopino tripsina/EDTA:** Po inkubaciji v bučke dodajte sveže pripravljeno raztopino tripsina/EDTA (0,05 % tripsin, 0,025 % EDTA), tako da so celice popolnoma pokrite - uporabite 1 ml za bučke T25 in 2,5 ml za bučke T75.
6. **Spremljajte ločevanje:** Opazujte celice, ki se morajo odcepiti v 1-2 minutah.
7. **Nevtralizirajte tripsin:** Dodajte gojišče za gojenje celic, ki vsebuje FBS, da ustavite delovanje tripsina.
8. **Prenesite celice:** Celično suspenzijo prelijte v nove erlenmajerice, predhodno napolnjene s svežim gojiščem.

Seeding density

 1×10^4 celic/cm²

Fluid renewal

2-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, povzročene s kriom.

Celice HaCaT-ras II-4 | 300495

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 krioviala takoj shranite pri temperaturi pod $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 krioviala 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 $300 \times g$ 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

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , vlažno ozračje.

Flask Coating

Nič

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 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ob prejemu takoj preglejte embalažo in vialo nemudoma prenesite v ustrezno skladišče.

Celice HaCaT-ras II-4 | 300495

Storage Conditions

Za dolgotrajno shranjevanje vial 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.

Nadzor kakovosti / Genetski profil / HLA

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.