

celice imWilms1 | 300412

Splošne informacije

Description

Celična linija Wilms1 je bila prvotno pridobljena iz primarnega Wilmsovega tumorja, ki je bil pridobljen od bolnika z velikimi obojestranskimi tumorji ledvic, kar je značilna oblika Wilmsovega tumorja (nefroblastoma). Ta celična linija ima homozigotno nesmiselno mutacijo v genu WT1 (c.149 C>A, p.S50X), ki povzroča nastajanje skrajšanega, nefunkcionalnega proteina WT1. Gen WT1 je ključnega pomena za razvoj ledvic, njegova mutacija pa je tesno povezana s patogenezo Wilmsovega tumorja, zlasti pri tumorjih s stromalno diferenciacijo. Celice Wilms1 imajo stabilen kariotip brez večjih kromosomskih nepravilnosti, zanje je značilen mezenhimski fenotip, saj izražajo vimentin, nimajo pa epiteljskih označevalcev, kot je citokeratin. Linija kaže omejeno, vendar pomembno sposobnost mezenhimske diferenciacije, vključno z možnostjo diferenciacije v mišične celice pod posebnimi pogoji, zaradi česar je ključni model za preučevanje molekularnih posledic mutacij WT1.

Da bi premagali omejeno življenjsko dobo primarnih celic Wilms1, je bila celična linija imWilms1 vzpostavljena z vnosom trojnega mutiranega antigena SV40 velikega T (U19dl89-97tsA58) v prvotne tumorske celice, kar je omogočilo njihovo nesmrtnost. Ta modifikacija omogoča celicam imWilms1 neomejeno razmnoževanje ob ohranjanju kromosomske stabilnosti, s tem pa ponuja zanesljiv model za dolgoročne študije. Imortalizirane celice imWilms1 še naprej kažejo isto mutacijo WT1 in ohranjajo mezenhimske značilnosti starševske linije Wilms1.

Poleg genetskih in fenotipskih značilnosti je bila celična linija imWilms1 obsežno analizirana glede aktivnosti signalnih poti. Proteomske študije so razkrile fosforilacijo in aktivacijo več receptorjskih tirozin kinaz (RTK), vključno z EGFR, PDGFR β in AXL, z nadaljnjo aktivacijo signalnih poti MAPK. Dosledna aktivacija teh poti v celicah imWilms1 poudarja njihov pomen za raziskovanje ciljnih terapevtskih strategij pri tumorju Wilms. Na splošno je imWilms1 zanesljiv in dolgoročen model za raziskovanje molekularnih mehanizmov, ki so podlaga za razvoj in napredovanje tumorja Wilms, zlasti tistih, ki so posledica mutacij WT1 in aberantnih signalnih poti.

Organism Človek

Tissue Ledvice

Disease Wilmsov tumor

Synonyms IM-WT-1

Značilnosti

Age 10 mesecev

Gender Ženske

Ethnicity Kavkaški

Morphology Vretenasta oblika

celice imWilms1 | 300412**Cell type** Wilmsove celice**Growth properties** Pripadajoče**Regulativni podatki****Citation** imWilms1 (Cytionova kataloška številka 300412)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_A5SN**GMO Status** GMO-S1: Ta linija človeškega Wilmsovega tumorja imWilms1 vsebuje trojno mutantno kaseto SV40 T-antigen, ki omogoča pogojno imortalizacijo za raziskave nefroblastoma. Ta razvrstitev velja samo v Nemčiji in se lahko drugje razlikuje.**Biomolekularni podatki****Mutational profile** Status mutacije WT1: homozigotna c. 149 C>A, p.S50x, LOH: 11p11-11pter, status mutacije CTNNB1: heterozigotna TCT>TTT, p.S45F**Ravnanje s spletno stranjo****Culture Medium** Komplet MSCGM (Lonza)**Dissociation Reagent** Accutase**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.**Fluid renewal** 1 do 2-krat na teden

celice imWilms1 | 300412

Freeze medium

Kot gojišče za kriokonzervacijo uporabljamo popolno rastno gojišče (vključno s FBS) + 10 % DMSO za ustrezno vitalnost po odmrznitvi ali CM-1 (katalogska številka 800100 podjetja Cytion), ki vključuje optimizirane osmoprotektante in presnovne stabilizatorje za izboljšanje okrevanja in zmanjšanje stresa, povzročenga 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 $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, 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 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 $300 \times g$ 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

Za optimalno pritrnitev in sposobnost preživetja po odmrznitvi priporočamo uporabo s **kolagenom prevlečenih bučk ali plošč**.

celice imWilms1 | 300412

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.

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.

Aleli 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