

Celice B-LCL-HROC60 | 302004**Splošne informacije****Description**

B-LCL-HROC60 je človeška B-limfoblastna celična linija, nesmrtonosna zaradi virusa Epstein-Barr (EBV), vzpostavljena iz tumorja infiltrirajočih B-celic (TiBc), izoliranih iz primarnega kolorektalnega karcinoma, imenovanega HROC60. Izvorni tumor je izviral od odraslega moškega pacienta z desnostranskim kolorektalnim karcinomom molekularnega podtipa CpG island methylator phenotype-high (CIMP-H). Sveže tumorsko tkivo je bilo mehansko razgrajeno, da se je pridobilo suspenzije enoceličnih celic, B-celice pa so bile selektivno nesmrtonosne in vitro z uporabo supernatanta, ki vsebuje EBV, pridobljenega iz celične linije marmoset B95/8 v prisotnosti ciklosporina A za zaviranje rasti T- in NK-celic. Dolgoročna ekspanzija je privedla do monoklonske kulture B-celic, kar je potrdila analiza prerazporeditve genov težkih in lahkih verig imunoglobulina z uporabo standardiziranih klonalnih testov.

B-LCL-HROC60 izloča imunoglobulin M (IgM) kot svoj prevladujoči izotip, s stabilno proizvodnjo v podaljšanem kultiviranju. V širši seriji tumorjev infiltriranih B-celičnih linij, ustvarjenih iz kolorektalnega karcinoma, je bilo izločanje imunoglobulina omejeno na en sam glavni izotip na klon, spontana rast pa se ni pojavila v odsotnosti eksogenega EBV, kar izključuje latentno in vivo transformacijo, povzročeno z EBV. Kot monoklonalna, antigen-izkušena linija, pridobljena iz TiBc iz kolorektalnega karcinoma CIMP-H, B-LCL-HROC60 zagotavlja relevanten in vitro model za preučevanje humoralnih imunskih odzivov v mikrookolju kolorektalnega tumorja in za karakterizacijo funkcionalnih lastnosti protiteles, pridobljenih iz B-celic, ki infiltrirajo tumor.

Organism Človek**Tissue** Periferna kri**Disease** Karcinom**Synonyms** Bc HROC60, TiBcHROC60**Značilnosti****Age** 71 let**Gender** Moški**Ethnicity** Kavkaški**Morphology** Okrogle celice**Cell type** Limfoblast B**Growth properties** Vzmetenje

Celice B-LCL-HROC60 | 302004**Regulativni podatki****Citation** B-LCL-HROC60 (kataloška številka Cytion 302004)**Biosafety level** 2**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_A7UT**Biomolekularni podatki****Surface antigens** CD19**Viruses** Transformant: EBV**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 % toplotno aktiviranega FBS**Subculturing** Nežno homogenizirajte celično suspenzijo v kolbi s pipetiranjem navzgor in navzdol, nato odzemi reprezentativni vzorec za določitev gostote celic na ml. Suspenzijo razredčite, da dosežete koncentracijo celic 1×10^5 celic/ml s svežim kultiviranim medijem, in prilagojeno suspenzijo razdelite v nove kolbe za nadaljnje gojenje.**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 B-LCL-HROC60 | 302004

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 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**.

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.

Celice B-LCL-HROC60 | 302004

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*: '02:01:01, '11:01:01
B*: '44:02:01, '55:01:01
C*: '03:03:01, '05:01:01
DRB1*: '01:01:01, '13:01:01
DQA1*: '01:01:01, '01:03:01
DQB1*: '05:01:01, '06:03:01
DPB1*: '04:01:01
E: '01:01:01