Product sheet

Клітини NCI-H1299-RFP | 300272

Загальна інформація

Description	Клітини NCI-H1299 RFP, модифіковані для включення репортера в ген DAPK1, не тільки корисні для вивчення специфічної активації генів, але й забезпечують більш широке розуміння того, як клітини реагують на епігенетичні препарати в усьому світі. Використовуючи методику під назвою Cap Analysis of Gene Expression (CAGE), дослідники змогли детально проаналізувати зміни в місцях початку транскрипції в геномі у відповідь на лікування препаратами DNMTi (DAC), HDACi (SAHA або SB939) або їх комбінаціями. Цей метод виявляє не лише очікувану реактивацію гена DAPK1, але й появу нових сайтів запуску транскрипції, які називаються індукованими лікуванням неанотованими сайтами запуску транскрипції (TSS), особливо під час лікування препаратами. Ці нові сайти, як правило, розташовані в ділянках геному, які зазвичай не продукують білки, і призводять до створення нових молекул РНК, які потенційно можуть кодувати білки. Подальший аналіз показує, що ці нові молекули РНК іноді можуть зливатися з існуючими, утворюючи так звані транскрипти злиття TINAT-екзонів. Залежно від того, як ці транскрипти зрощуються, вони можуть перетворюватися на нові, нетипові білки. Цей процес був підтверджений за допомогою лабораторних методів, які демонструють, що ці транскрипти дійсно можуть призводити до утворення нових форм білків. Ці білки можуть аномально взаємодіяти всередині клітини або розпізнаватися імунною системою як чужорідні, потенційно пропонуючи нові мішені для терапії раку. Активація цих TINAT включає складні зміни в метилюванні ДНК та модифікації гістонів, що ілюструє складну взаємодію між цими епігенетичними факторами під час медикаментозного лікування. Зокрема, комбіноване застосування DAC та SB939 демонструє більший ефект, посилюючи експресію цих нових транскриптів більше, ніж при застосуванні кожного з препаратів окремо. Розуміння цих взаємодій та їх результатів допомагає з'ясувати, як епігенетична терапія змінює поведінку клітин, і відкриває можливості для нових методів лікування раку, які використовують ці складні молекулярні зміни.
Organism	Людина
Tissue	Легені
Disease	Великоклітинна карцинома
Metastatic site	Локалізація первинної пухлини (легені)
Applications	Дослідження в галузі епігенетичної терапії; реактивація гена DAPK1; дослідження реакції на препарати класу DNMTi та HDACi; неаннотовані точки старту транскрипції (TINAT), індуковані лікуванням; транскриптоміка методом CAGE; аналіз фузійних транскриптів; синтез атипових білків із прихованих промоторів; скринінг епігенетичних комбінацій лікарських засобів

Характеристики

Morphology	Епітеліальноподібні
Cell type	Епітеліальні клітини

Клітини NCI-H1299-RFP | 300272

Growth properties	Адепт

Нормативні дані

Citation	NCI-H1299-EGFP, з резистентністю до G418 та приглушеним репортером (DKFZ № P-1045) (номер у каталозі Cytion 300272)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_XB25
GMO Status	GMO-S1: Цей похідний штам NCI-H1299 (DKFZ #P-1045) містить репортер EGFP зі стабільно пригніченою експресією у локусі DAPK1, що дозволяє оцінювати епігенетичну реактивацію. Присутня касета резистентності до G418. Ця класифікація діє лише на території Німеччини і може відрізнятися в інших країнах.

Біомолекулярні дані

Обробка

Culture Medium	RPMI 1640, w: 2,0 мМ стабільний глютамін, w: 2,0 г/л NaHCO3 (номер за каталожним номером 820700a)
Supplements	Додайте до середовища 10% FBS
Dissociation Reagent	Аккутаза
Doubling time	приблизно від 24 до 36 годин
Subculturing	Видаліть старе середовище з прилиплих клітин і промийте їх PBS, в якому бракує кальцію і магнію. Для колб T25 використовуйте 3-5 мл PBS, а для колб T75 - 5-10 мл. Потім повністю покрийте клітини аккутазою, використовуючи 1-2 мл для колб T25 і 2,5 мл для колб T75. Залиште клітини інкубуватися при кімнатній температурі протягом 8-10 хвилин, щоб відокремити їх. Після інкубації обережно змішайте клітини з 10 мл середовища, щоб ресуспендувати їх, а потім центрифугуйте при 300xg протягом 3 хвилин. Викиньте надосадову рідину, ресуспендуйте клітини у свіжому середовищі та перенесіть їх у нові колби, які вже містять свіже середовище.
Split ratio	від 1 до 5

Клітини NCI-H1299-RFP | 300272

Seeding density	від 1 до 3 × 10^4 клітин/$см^2$
Fluid renewal	2-3 рази на тиждень
Freeze medium	Як середовище кріоконсервування ми використовуємо повне живильне середовище (включаючи FBS) + 10% ДМСО для адекватної життєздатності після відтавання або CM-1 (номер за каталогом Cytion 800100), до складу якого входять оптимізовані осмопротектори та метаболічні стабілізатори для прискорення відновлення та зменшення кріоіндукованого стресу.

Thawing and Culturing Cells

1. Переконайтеся, що віал залишається глибоко замороженим після доставки, оскільки клітини транспортуються на сухому льоду для підтримання оптимальної температури під час транспортування.

2. Після отримання негайно зберігайте кріовіал при температурі нижче -150°C, щоб забезпечити збереження клітинної цілісності, або перейдіть до кроку 3, якщо потрібне негайне культивування.

3. Для негайного культивування швидко розморозьте віал, зануривши його у водяну баню з чистою водою і антимікробним засобом при температурі 37°C, обережно перемішуючи протягом 40-60 секунд, поки не залишиться невелика крижана грудка.

4. Всі наступні кроки виконуйте в стерильних умовах у проточній витяжній шафі, дезінфікуючи кріовіал 70% етанолом перед відкриттям.

5. Обережно відкрийте продезінфікований флакон і перенесіть клітинну суспензію в 15 мл центрифужну пробірку, що містить 8 мл культурального середовища кімнатної температури, обережно перемішуючи.

6. Відцентрифугуйте суміш при 300 x g протягом 3 хвилин, щоб відокремити клітини, і обережно викиньте надосадову рідину, що містить залишки заморожувального середовища.

7. Обережно ресуспендуйте осад клітин у 10 мл свіжого культурального середовища. Для адгезивних клітин розділіть суспензію між двома культуральними колбами T25; для суспензійних культур перенесіть все середовище в одну колбу T25, щоб сприяти ефективній взаємодії та росту клітин.

8. Дотримуйтесь встановлених протоколів субкультивування для продовження росту і підтримання клітинної лінії, забезпечуючи надійні результати експерименту.

Incubation Atmosphere	37°C, 5% $_{CO2}$, волога атмосфера.

Клітини NCI-H1299-RFP | 300272

Flask Coating	Ні
Freezing Procedure	Кріоконсервовані клітинні лінії транспортуються на сухому льоду в перевіреній ізольованій упаковці з достатньою кількістю холодоагенту для підтримання температури приблизно -78 °C під час транспортування. При отриманні негайно огляньте контейнер і негайно перемістіть віали у відповідне місце для зберігання.
Shipping Conditions	Кріоконсервовані клітинні лінії транспортуються на сухому льоду в перевіреній ізольованій упаковці з достатньою кількістю холодоагенту для підтримання температури приблизно -78 °C під час транспортування. При отриманні негайно огляньте контейнер і негайно перемістіть віали у відповідне місце для зберігання.
Storage Conditions	Для тривалого зберігання помістіть флакони в парофазний рідкий азот при температурі від -150 до -196 °C. Зберігання при -80 °C допустиме лише як короткий проміжний етап перед перенесенням у рідкий азот.

Контроль якості та молекулярний аналіз

Sterility	Зараження мікоплазмою виключається за допомогою аналізів на основі ПЛР та люмінесцентних методів виявлення мікоплазми. Щоб переконатися у відсутності бактеріального, грибкового або дріжджового забруднення, клітинні культури піддаються щоденному візуальному контролю.