

## Клітини HaCaT-ras A5 | 300494

## Загальна інформація

## Description

Клітини HaCaT-ras A5 - це спонтанно іморталізована, непухлинна клітинна лінія кератиноцитів шкіри людини, яка використовується для вивчення взаємодії пухлинного мікрооточення та прогресування карциноми шкіри. Ці клітини, отримані від 62-річного чоловіка європейської раси, пройшли клональну селекцію та мутагенез, які в поєднанні з аутокринною регуляцією фактора росту уможливають утворення повільно зростаючих, високодиференційованих доброякісних кістозних пухлин у мишей лінії Balb/c-nu/nu. Це робить їх цінною моделлю для дослідження клітинної динаміки та молекулярних механізмів пухлинної прогресії in vivo.

Клітини HaCaT-ras A5 особливо корисні для з'ясування складних взаємодій між пухлинними клітинами та оточуючими стромальними клітинами, включаючи фібробласти, імунні клітини та ендотеліальні клітини. Ці взаємодії опосередковуються секрецією різних сигнальних молекул, таких як фактори росту, цитокіни та протеази, серед яких ключову роль відіграє інтерлейкін-6 (IL-6). Відомо, що IL-6 порушується при багатьох видах раку, в першу чергу через надмірну експресію або постійну активацію фактора транскрипції STAT3.

Дослідження показали, що стимуляція IL-6 клітин HaCaT-ras A5 значно збільшує їх проліферацію через сигнальний шлях JAK/STAT, в той час як фібробласти залишаються незацепленими через більш потужне пригнічення SOCS3, негативного регулятора цього шляху. Ця диференційована відповідь була відображена в математичній моделі, що описує динаміку STAT3 і SOCS3, забезпечуючи більш глибоке розуміння клітинно-специфічних сигнальних каскадів.

Крім того, IL-6 не тільки безпосередньо впливає на проліферацію клітин HaCaT-ras A5, але й опосередковано впливає на клітинне середовище через активацію мережі факторів росту, таких як HGF, KGF, VEGF та IL-8. Аналіз експресії генів за участю понад 16 000 генів показав, що стимуляція IL-6 підвищує регуляцію 19 генів, пов'язаних із сигнальним шляхом інтерферону, як у клітинах HaCaT-ras A5, так і у фібробластах, що корелює зі спостережуваним пригніченням росту у фібробластів.

Відкриття вирішальної ролі SerpinB4 у проліферації клітин HaCaT-ras A5, підтверджене експериментами з нокадауном siRNA, підкреслює складну регуляцію IL-6 як у пухлинних, так і в стромальних клітинах. Таке комплексне розуміння ролі IL-6 розширює можливості для розробки цілеспрямованих терапевтичних стратегій, спрямованих на модуляцію сигнальних шляхів IL-6 в пухлинному мікрооточенні.

В цілому, клітини HaCaT-ras A5 пропонують надійну модель для вивчення складної взаємодії в мікрооточенні пухлини, прокладаючи шлях для нових підходів у дослідженні раку та розробці терапії.

**Organism** Людина

**Tissue** Шкіра

**Synonyms** HaCaT-ras клон A-5, HaCaT A-5, A-5, A5

## Характеристики

**Age** 62 роки

## Клітини HaCaT-ras A5 | 300494

<b>Gender</b>	Чоловік
<b>Ethnicity</b>	Кавказець
<b>Cell type</b>	Кератиноцит
<b>Growth properties</b>	Адепт

## Нормативні дані

<b>Citation</b>	HaCaT-ras A5 (номер за каталогом Cytion 300494)
<b>Biosafety level</b>	1
<b>NCBI_TaxID</b>	9606
<b>CellosaurusAccession</b>	CVCL_xK16
<b>GMO Status</b>	ГМО-S1: Ця лінія HaCaT-ras A5 містить плазмідну конструкцію онкогену c-Ha-ras для дослідження епітеліальної трансформації. Ця класифікація застосовується лише в Німеччині і може відрізнятися в інших країнах.

## Біомолекулярні дані

<b>Protein expression</b>	P53 (+), CEA (+),
<b>Tumorigenic</b>	Утворення доброякісних пухлин у мишей лінії Balb/c-nu/nu.
<b>Karyotype</b>	Анеуплоїдний (гіпотетраплоїдний)

## Обробка

<b>Culture Medium</b>	DMEM, w: 4,5 г/л Глюкоза, w: 4 мМ L-глутамін, w: 3,7 г/л NaHCO <sub>3</sub> , w: 1,0 мМ піруват натрію (цит. номер 820300a)
<b>Supplements</b>	Додайте до середовища 10% FBS

## Клітини HaCaT-ras A5 | 300494

**Dissociation Reagent**

Суміш 1:1 ЕДТА (0,05%) і трипсину (0,1%) необхідно готувати щоразу перед відділенням клітин, використовуючи PBS без Ca<sup>2+</sup> і Mg<sup>2+</sup>, щоб забезпечити фізіологічну осмолярність. Готові до використання суміші трипсину/ЕДТА не рекомендуються, оскільки це може призвести до утворення згустків клітин. Як альтернативу можна використовувати TrypLETM Express (Life Technologies) замість трипсину/ЕДТА. Слід дотримуватися протоколу виробника.

**Subculturing**

1. **Викиньте старий носій:** Видаліть старе середовище з колб.
2. **Промийте клітини:** Додайте 3-5 мл PBS (без кальцію і магнію) в колби T25 або 5-10 мл в колби T75, щоб відмити прилиплі клітини.
3. **Додайте розчин ЕДТА:** Повністю покрийте шар клітин свіжоприготованим 0,05% розчином ЕДТА - 1-2 мл для колб T25 і 2,5 мл для колб T75.
4. **Інкубація:** Інкубуйте колби при 37 градусах Цельсія протягом 10 хвилин.
5. **Додайте розчин трипсину/ЕДТА:** Після інкубації додайте в колби свіжоприготований розчин трипсину/ЕДТА (0,05% трипсину, 0,025% ЕДТА), переконавшись, що клітини повністю покриті - використовуйте 1 мл для колб T25 і 2,5 мл для колб T75.
6. **Простежте за відшаруванням:** Спостерігайте за клітинами, які повинні відокремитися протягом 1-2 хвилин.
7. **Нейтралізуйте трипсин:** Додайте середовище для культивування клітин, що містить FBS, щоб зупинити активність трипсину.
8. **Перенесіть клітини:** Розподіліть клітинну суспензію в нові колби, попередньо заповнені свіжим живильним середовищем.

**Seeding density**

$1 \times 10^4$  клітин/см<sup>2</sup>

**Fluid renewal**

2 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.

**Клітини HaCaT-ras A5 | 300494****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  $-150^{\circ}\text{C}$ , щоб забезпечити збереження клітинної цілісності, або перейдіть до кроку 3, якщо потрібне негайне культивування.
3. Для негайного культивування швидко розморозьте віал, зануливши його у водяну баню з чистою водою і антимікробним засобом при температурі  $37^{\circ}\text{C}$ , 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  $300 \times g$  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. Дотримуйтеся встановлених протоколів субкультивування для продовження росту і підтримання клітинної лінії, забезпечуючи надійні результати експерименту.

**Incubation  
Atmosphere**

$37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , волога атмосфера.

**Flask Coating**

Ні

**Freezing  
Procedure**

Кріоконсервовані клітинні лінії транспортуються на сухому льоду в перевірній ізольованій упаковці з достатньою кількістю холодоагенту для підтримання температури приблизно  $-78^{\circ}\text{C}$  під час транспортування. При отриманні негайно огляньте контейнер і негайно перемістіть віали у відповідне місце для зберігання.

**Клітини HaCaT-ras A5 | 300494****Shipping  
Conditions**

Кріоконсервовані клітинні лінії транспортуються на сухому льоду в перевірній 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 / Генетичний профіль / HLA****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.

**HLA алелі**

**A\***: '31:01:02  
**B\***: '40:01:02, '51:01:01  
**C\***: '03:04:01, '15:02:01  
**DRB1\***: '04:01:01, '15:01:01G  
**DQA1\***: '01:02:01, '03:03:01  
**DQB1\***: '03:01:01, '06:02:01  
**DPB1\***: '03:01:01G, '04:01:01G  
**E**: '01:03:01, '01:03:02