

Клітини гепатиту 56.1B | 400202

Загальна інформація

Description

Клітинна лінія гепатоми Hep-70.4 отримана з пухлини печінки миші, а саме зі штаму миші C57BL/6J. Ця клітинна лінія відрізняється наявністю мутацій в гені p53, які були ідентифіковані на різних пасажах під час розмноження in vitro. На пасажі № 8 в аналізі одноланцюгового конформаційного поліморфізму (SSCP) було виявлено слабкий додатковий сигнал, що вказує на наявність мутації p53. У пасажі № 38 було ідентифіковано дві окремі точкові мутації p53: трансверсію G:C на C:G у кодоні 135 та трансверсію C:G на G:C у кодоні 138 екзону 5. Ці мутації призвели до заміни амінокислот з аланіну на пролін та цистеїну на триптофан відповідно.

Клітинна лінія Hep-70.4 має морфологічний фенотип, який значно змінюється в процесі розмноження. Деякі сублінії демонструють епітеліальну морфологію, тоді як інші - фібробластоподібну. Ця гетерогенність відображає складну природу клітинної лінії та її пристосованість до різних умов культивування. Присутність як нормальних, так і мутованих алелів p53 в ранніх пасажах свідчить про те, що мутації надають перевагу селективному росту, що призводить до переважання мутованих клонів з часом.

Аналіз білків проміжних філаментів клітинної лінії Hep-70.4 виявив експресію простих кератинів K8 і K18, які є типовими для нормальних клітин печінки, а також віментину і кератину K19 в різному ступені. Ці білкові патерни підтверджують гепатоцитарне походження клітинної лінії та її класифікацію як лінії гепатоми. Геномна стабільність Hep-70.4 була додатково оцінена за допомогою аналізу ДНК-відбитків, який не виявив жодних серйозних структурних аномалій, хоча зі збільшенням кількості пасажів спостерігалися зміни відносної інтенсивності певних смуг.

Organism

Миша

Tissue

Печінка

Disease

Гепатоцелюлярна карцинома

Synonyms

HEP-56.1B, 56.1B, 56.1b

Характеристики

Breed/Subspecies

C57BL/6J

Age

Дорослий

Gender

Жінка

Morphology

Епітеліальноподібні

Growth properties

Адепт

Клітини гепатиту 56.1B | 400202

Нормативні дані

Citation	Нер-56.1B (номер за каталогом Cytion 400202)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	10090
CellosaurusAccession	CVCL_5767

Біомолекулярні дані

Protein expression	Кератин 8, Кератин 18, Віментин.
Tumorigenic	Так, у мишей C57BL/6J
Mutational profile	P53mut (кодон 277 в екзоні 8 => Аргінін -- Треонін).

Обробка

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 г/л Глюкоза, w: 4 мМ L-глутамін, w: 3,7 г/л NaHCO ₃ , w: 1,0 мМ піруват натрію (цит. номер 820300a)
Supplements	Додайте до середовища 10% FBS
Dissociation Reagent	Аккутаза
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 300хг протягом 3 хвилин. Викиньте надосадову рідину, ресуспендуйте клітини у свіжому середовищі та перенесіть їх у нові колби, які вже містять свіже середовище.
Seeding density	1×10^4 клітин / см ²
Fluid renewal	Кожні 3-5 днів

Клітини гепатиту 56.1B | 400202

Post-Thaw Recovery

Після розморожування висійте клітини з щільністю 5×10^4 клітин/ cm^2 і дайте клітинам відновитися після процесу заморожування та прикріпитися протягом щонайменше 24 годин.

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, зануливши 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 $300 \times g$ 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. Дотримуйтесь встановлених протоколів субкультивування для продовження росту і підтримання клітинної лінії, забезпечуючи надійні результати експерименту.

Incubation Atmosphere

37°C , 5% CO_2 , волога атмосфера.

Flask Coating

Hi

Клітини гепатиту 56.1B | 400202

Freezing Procedure

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.

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.