NCI-H1299-RFP-solut

300272

NCI-H1299 RFP -solut, jotka on muunnettu siten, että ne sisältävät DAPK1-geenin reportterin, eivät ole hyödyllisiä ainoastaan tietyn geenin aktivoitumisen tutkimisessa, vaan ne antavat myös laajemman käsityksen siitä, miten solut reagoivat epigeneettisiin lääkkeisiin maailmanlaajuisesti. Käyttämällä Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) -tekniikkaa tutkijat ovat pystyneet selvittämään yksityiskohtaisesti muutokset siinä, missä transkriptio alkaa koko genomissa, kun he saavat hoitoja DNMTi:llä (DAC), HDACi:lla (SAHA tai SB939) tai niiden yhdistelmillä. Menetelmä paljastaa DAPK1-geenin odotetun uudelleenaktivoitumisen lisäksi myös uusien transkription aloituskohtien, joita kutsutaan hoidon aiheuttamiksi ei-annotoiduiksi TSS-kohdiksi (TINAT), syntymisen erityisesti lääkehoidon yhteydessä. Nämä uudet aloituskohdat sijaitsevat tyypillisesti genomin alueilla, jotka eivät yleensä tuota proteiineja, ja ne johtavat sellaisten uusien RNA-molekyylien syntyyn, jotka voisivat mahdollisesti koodata proteiineja.
Tarkempi analyysi osoittaa, että nämä uudet RNA-molekyylit voivat joskus yhdistyä olemassa oleviin molekyyleihin muodostaen niin sanottuja TINAT-exon-fuusio-transkriptejä. Riippuen siitä, miten nämä transkriptit liitetään, ne voivat kääntyä uusiksi epätyypillisiksi proteiineiksi. Tämä prosessi on vahvistettu laboratoriotekniikoilla, jotka osoittavat, että nämä transkriptit voivat todellakin johtaa uusien proteiinimuotojen tuotantoon. Nämä proteiinit voivat olla epänormaalissa vuorovaikutuksessa solun sisällä tai immuunijärjestelmä voi tunnistaa ne vieraiksi, mikä voi tarjota uusia kohteita syöpähoitoon.
Näiden TINATien aktivoitumiseen liittyy monimutkaisia muutoksia sekä DNA-metylaatiossa että histonimodifikaatioissa, mikä osoittaa näiden epigeneettisten tekijöiden monimutkaisen vuorovaikutuksen lääkehoidon yhteydessä. Erityisesti DAC:n ja SB939:n yhdistelmäkäytöllä on suurempi vaikutus, sillä se lisää näiden uusien transkriptien ilmentymistä enemmän kuin kumpaakin lääkettä yksinään käytettäessä. Näiden vuorovaikutusten ja niiden tulosten ymmärtäminen auttaa selventämään, miten epigeneettiset hoidot muuttavat solujen käyttäytymistä, ja avaa mahdollisuuksia uusille syöpähoidoille, jotka hyödyntävät näitä monimutkaisia molekyylimuutoksia.

YLEISTÄ TIETOA

Kuvaus

NCI-H1299 RFP -solut, jotka on muunnettu siten, että ne sisältävät DAPK1-geenin reportterin, eivät ole hyödyllisiä ainoastaan tietyn geenin aktivoitumisen tutkimisessa, vaan ne antavat myös laajemman käsityksen siitä, miten solut reagoivat epigeneettisiin lääkkeisiin maailmanlaajuisesti. Käyttämällä Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) -tekniikkaa tutkijat ovat pystyneet selvittämään yksityiskohtaisesti muutokset siinä, missä transkriptio alkaa koko genomissa, kun he saavat hoitoja DNMTi:llä (DAC), HDACi:lla (SAHA tai SB939) tai niiden yhdistelmillä. Menetelmä paljastaa DAPK1-geenin odotetun uudelleenaktivoitumisen lisäksi myös uusien transkription aloituskohtien, joita kutsutaan hoidon aiheuttamiksi ei-annotoiduiksi TSS-kohdiksi (TINAT), syntymisen erityisesti lääkehoidon yhteydessä. Nämä uudet aloituskohdat sijaitsevat tyypillisesti genomin alueilla, jotka eivät yleensä tuota proteiineja, ja ne johtavat sellaisten uusien RNA-molekyylien syntyyn, jotka voisivat mahdollisesti koodata proteiineja.
Tarkempi analyysi osoittaa, että nämä uudet RNA-molekyylit voivat joskus yhdistyä olemassa oleviin molekyyleihin muodostaen niin sanottuja TINAT-exon-fuusio-transkriptejä. Riippuen siitä, miten nämä transkriptit liitetään, ne voivat kääntyä uusiksi epätyypillisiksi proteiineiksi. Tämä prosessi on vahvistettu laboratoriotekniikoilla, jotka osoittavat, että nämä transkriptit voivat todellakin johtaa uusien proteiinimuotojen tuotantoon. Nämä proteiinit voivat olla epänormaalissa vuorovaikutuksessa solun sisällä tai immuunijärjestelmä voi tunnistaa ne vieraiksi, mikä voi tarjota uusia kohteita syöpähoitoon.
Näiden TINATien aktivoitumiseen liittyy monimutkaisia muutoksia sekä DNA-metylaatiossa että histonimodifikaatioissa, mikä osoittaa näiden epigeneettisten tekijöiden monimutkaisen vuorovaikutuksen lääkehoidon yhteydessä. Erityisesti DAC:n ja SB939:n yhdistelmäkäytöllä on suurempi vaikutus, sillä se lisää näiden uusien transkriptien ilmentymistä enemmän kuin kumpaakin lääkettä yksinään käytettäessä. Näiden vuorovaikutusten ja niiden tulosten ymmärtäminen auttaa selventämään, miten epigeneettiset hoidot muuttavat solujen käyttäytymistä, ja avaa mahdollisuuksia uusille syöpähoidoille, jotka hyödyntävät näitä monimutkaisia molekyylimuutoksia.

Kudos	Keuhkot
Sairaus	Suurisoluinen karsinooma
Metastaasikohde	Ensisijainen kasvainpaikka (keuhko)

Sovellukset

Epigeneettisen hoidon tutkimus; DAPK1-geenin uudelleenaktivointi; DNMTi- ja HDACi-lääkevasteiden tutkimukset; hoidon aiheuttamat merkitsemättömät transkriptiot alkukohdat (TINAT); CAGE-transkriptomiikka; fuusiotranskriptien analyysi; epätyypillisten proteiinien tuotanto kryptisistä promoottoreista; epigeneettisten lääkeyhdistelmien seulonta

Cytion GmbH
Nikola-Tesla-Str. 3
69124 Heidelberg
Tel: +49 (0)6221 405780
info@cytion.com
cytion.com

Registered office Heidelberg
VAT ID: DE283292917
Local court Mannheim - HRB 714394
CEO / Geschäftsführer: Jonathan Steubing

Banking information
Sparkasse Heidelberg
IBAN: DE35 6725 0020 0009 2076 86
BIC: SOLADES1HDB

LUOKITTELU

Organismi	Ihminen
Kasvuominaisuudet	Kiinnittynyt
GMO-status	GMO-S1

GMO-statuksen tiedot

GMO-S1: This NCI-H1299 derivative (DKFZ #P-1045) contains a stably silenced EGFP reporter in the DAPK1 locus enabling epigenetic reactivation readout. G418-resistance cassette present. This classification applies only within Germany and may differ elsewhere.

Bioturvallisuustaso	1

OMINAISUUDET

Morfologia	Epiteelin kaltainen
Solutyyppi	Epiteelisolut
Kaksinkertaistumisaika	noin 24–36 tuntia

TUNNISTEET

Lähdeviite

NCI-H1299-EGFP, G418-resistenssillä ja vaimennetulla raportointigeenillä (DKFZ # P-1045) (Cytion-tuotenumero 300272)

NCBI-verotunnus	9606
Cellosaurus	CVCL_XB25

KÄSITTELY JA VILJELY

Viljelyalusta

RPMI 1640, w: 2,0 mM stabiilia glutamiinia, w: 2,0 g/L $NaHCO_3$ (Cytionin artikkelinumero 820700a)

Inkubaatioilma	37 °C, 5 %CO_2, kostutettu ilmakehä.

Ravintolisät

Täydennetään elatusainetta 10 %:lla FBS:llä

Dissosiaatioreagenssi	Accutase

Soluviljely

Poista vanha väliaine tarttuneista soluista ja pese ne PBS:llä, josta puuttuu kalsiumia ja magnesiumia. Käytä T25-pulloissa 3-5 ml PBS:ää ja T75-pulloissa 5-10 ml. Peitä sitten solut kokonaan Accutase-valmisteella, käyttäen 1-2 ml T25-pulloissa ja 2,5 ml T75-pulloissa. Anna solujen inkuboitua huoneenlämmössä 8-10 minuuttia solujen irtoamiseksi. Inkuboinnin jälkeen solut sekoitetaan varovasti 10 ml:n väliaineella niiden resuspendoimiseksi ja sentrifugoidaan sitten 300xg:n nopeudella 3 minuutin ajan. Hävitä supernatantti, suspendoi solut uudelleen tuoreeseen väliaineeseen ja siirrä ne uusiin pulloihin, jotka sisältävät jo tuoretta väliaineita.

Jakosuhde	1–5
Kylvötiheys	1–3 × 10^4 solua/cm^2
Nesteen uusiminen	2-3 kertaa viikossa

Sulatus ja viljely

Confirm that the vial remains deeply frozen upon delivery, as cells are shipped on dry ice to maintain optimal temperatures during transit.
Upon receipt, either store the cryovial immediately at temperatures below -150°C to ensure the preservation of cellular integrity, or proceed to step 3 if immediate culturing is required.
For immediate culturing, swiftly thaw the vial by immersing it in a 37°C water bath with clean water and an antimicrobial agent, agitating gently for 40-60 seconds until a small ice clump remains.
Perform all subsequent steps under sterile conditions in a flow hood, disinfecting the cryovial with 70% ethanol before opening.
Carefully open the disinfected vial and transfer the cell suspension into a 15 ml centrifuge tube containing 8 ml of room-temperature culture medium, mixing gently.
Centrifuge the mixture at 300 x g for 3 minutes to separate the cells and carefully discard the supernatant containing residual freezing medium.
Gently resuspend the cell pellet in 10 ml of fresh culture medium. For adherent cells, divide the suspension between two T25 culture flasks; for suspension cultures, transfer all the medium into one T25 flask to promote effective cell interaction and growth.
Adhere to established subculture protocols for continued growth and maintenance of the cell line, ensuring reliable experimental outcomes.

LAADUNVALVONTA JA KRYOSÄILYTYS

Hedelmättömyys

Mykoplasmakontaminaatio suljetaan pois sekä PCR-pohjaisilla määrityksillä että luminesenssiin perustuvilla mykoplasman osoitusmenetelmillä.
Bakteeri-, sieni- tai hiivakontaminaation välttämiseksi soluviljelmät tarkastetaan päivittäin silmämääräisesti.

Jäädytysaine	Kryosäilytysmediana käytämme täydellistä kasvualustaa (mukaan lukien FBS) + 10 % DMSO:ta riittävän sulatuksen jälkeisen elinkelpoisuuden varmistamiseksi tai CM-1:tä (Cytionin luettelonumero 800100), joka sisältää optimoituja osmoprotectantteja ja metabolisia stabilisaattoreita, jotka parantavat elpymistä ja vähentävät kryosäilytyksen aiheuttamaa stressiä.

Säilytysolosuhteet

Pitkäaikaissäilytystä varten injektiopullot asetetaan höyryfaasissa olevaan nestemäiseen typpeen noin -150 - -196 °C:een. Säilytys -80 °C:ssa on hyväksyttävää vain lyhyenä välivaiheena ennen siirtoa nestemäiseen typpeen.

Toimitusehdot

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäässä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

OIKEUDELLISET JA TURVALLISUUSASIAT

Turvallisuusohjeet

Kun suunnitellaan kryoputken säilyttämistä nestemäisessä typessä sulatusta varten, on noudatettava tiukkoja turvatoimenpiteitä. Asianmukaiset suojakäsineet ja -vaatteet ovat välttämättömiä, ja kasvonaamarin tai suojalasien käyttö on välttämätöntä siirrettäessä jäädytettyjä näytteitä nestetyppisäiliöön tai siitä pois. Tällä pyritään pienentämään loukkaantumisriskiä, joka aiheutuu kryoputkien mahdollisista räjähdyksistä, jotka voivat aiheuttaa terävien sirpaleiden sinkoutumisen.

Takuu

Me Cytionilla seisomme tuotteidemme laadun ja elinkelpoisuuden takana.
Takaamme, että solumme ovat elinkelpoisia viljelyn alkaessa 60 päivän ajan sen jälkeen, kun ne on lähetetty laitoksestamme.
Vakuutamme, että kaikki materiaalit ovat analyysitodistuksessa ja/tai tuoteselosteessa kuvattujen eritelmien mukaisia
Lisätietoja on <a href=""/Who-we-are/Warranty/"" hreflang=""""x-default"">Takuulausumassa

Sovelletaan kolmansien osapuolten kanssa tehtyjä sopimuksia	Yes