Komórki NCI-H1299-RFP

300272

Komórki NCI-H1299 RFP, zmodyfikowane tak, aby zawierały reporter w genie DAPK1, są nie tylko przydatne do badania aktywacji określonych genów, ale także zapewniają szersze zrozumienie tego, jak komórki reagują globalnie na leki epigenetyczne. Korzystając z techniki zwanej Cap Analysis of Gene Expression (CAGE), naukowcy byli w stanie szczegółowo określić zmiany w miejscu rozpoczęcia transkrypcji w całym genomie w odpowiedzi na leczenie DNMTi (DAC), HDACi (SAHA lub SB939) lub ich kombinacjami. Metoda ta ujawnia nie tylko oczekiwaną reaktywację genu DAPK1, ale także pojawienie się nowych miejsc startu transkrypcji, zwanych indukowanymi leczeniem nieanotowanymi TSS (TINAT), szczególnie pod wpływem leczenia farmakologicznego. Te nowe miejsca startu są zwykle zlokalizowane w regionach genomu, które zwykle nie wytwarzają białek i prowadzą do tworzenia nowych cząsteczek RNA, które mogą potencjalnie kodować białka.
Dalsza analiza pokazuje, że te nowe cząsteczki RNA mogą czasami łączyć się z istniejącymi, tworząc tak zwane transkrypty fuzyjne TINAT-exon. W zależności od tego, w jaki sposób te transkrypty są łączone, mogą one przekładać się na nowe, nietypowe białka. Proces ten został potwierdzony za pomocą technik laboratoryjnych, które wykazały, że transkrypty te mogą rzeczywiście prowadzić do produkcji nowych form białek. Białka te mogą wchodzić w nieprawidłowe interakcje w komórce lub być rozpoznawane jako obce przez układ odpornościowy, potencjalnie oferując nowe cele dla terapii przeciwnowotworowej.
Aktywacja tych TINAT wiąże się ze skomplikowanymi zmianami zarówno w metylacji DNA, jak i modyfikacjach histonów, co ilustruje złożoną interakcję między tymi czynnikami epigenetycznymi pod wpływem leczenia farmakologicznego. W szczególności, połączone stosowanie DAC i SB939 wykazuje większy efekt, zwiększając ekspresję tych nowych transkryptów bardziej niż w przypadku stosowania każdego z leków osobno. Zrozumienie tych interakcji i ich wyników pomaga wyjaśnić, w jaki sposób terapie epigenetyczne zmieniają zachowanie komórek i otwiera możliwości nowych metod leczenia raka, które wykorzystują te złożone zmiany molekularne.

INFORMACJE OGÓLNE

Opis

Komórki NCI-H1299 RFP, zmodyfikowane tak, aby zawierały reporter w genie DAPK1, są nie tylko przydatne do badania aktywacji określonych genów, ale także zapewniają szersze zrozumienie tego, jak komórki reagują globalnie na leki epigenetyczne. Korzystając z techniki zwanej Cap Analysis of Gene Expression (CAGE), naukowcy byli w stanie szczegółowo określić zmiany w miejscu rozpoczęcia transkrypcji w całym genomie w odpowiedzi na leczenie DNMTi (DAC), HDACi (SAHA lub SB939) lub ich kombinacjami. Metoda ta ujawnia nie tylko oczekiwaną reaktywację genu DAPK1, ale także pojawienie się nowych miejsc startu transkrypcji, zwanych indukowanymi leczeniem nieanotowanymi TSS (TINAT), szczególnie pod wpływem leczenia farmakologicznego. Te nowe miejsca startu są zwykle zlokalizowane w regionach genomu, które zwykle nie wytwarzają białek i prowadzą do tworzenia nowych cząsteczek RNA, które mogą potencjalnie kodować białka.
Dalsza analiza pokazuje, że te nowe cząsteczki RNA mogą czasami łączyć się z istniejącymi, tworząc tak zwane transkrypty fuzyjne TINAT-exon. W zależności od tego, w jaki sposób te transkrypty są łączone, mogą one przekładać się na nowe, nietypowe białka. Proces ten został potwierdzony za pomocą technik laboratoryjnych, które wykazały, że transkrypty te mogą rzeczywiście prowadzić do produkcji nowych form białek. Białka te mogą wchodzić w nieprawidłowe interakcje w komórce lub być rozpoznawane jako obce przez układ odpornościowy, potencjalnie oferując nowe cele dla terapii przeciwnowotworowej.
Aktywacja tych TINAT wiąże się ze skomplikowanymi zmianami zarówno w metylacji DNA, jak i modyfikacjach histonów, co ilustruje złożoną interakcję między tymi czynnikami epigenetycznymi pod wpływem leczenia farmakologicznego. W szczególności, połączone stosowanie DAC i SB939 wykazuje większy efekt, zwiększając ekspresję tych nowych transkryptów bardziej niż w przypadku stosowania każdego z leków osobno. Zrozumienie tych interakcji i ich wyników pomaga wyjaśnić, w jaki sposób terapie epigenetyczne zmieniają zachowanie komórek i otwiera możliwości nowych metod leczenia raka, które wykorzystują te złożone zmiany molekularne.

Chusteczka	Płuco
Choroba	Rak wielkokomórkowy
Miejsce przerzutów	Miejsce występowania guza pierwotnego (płuco)

Zastosowania

Badania nad terapią epigenetyczną; reaktywacja genu DAPK1; badania nad odpowiedzią na leki z grupy DNMTi i HDACi; nieopisane miejsca rozpoczęcia transkrypcji (TINAT) wywołane leczeniem; transkryptomika metodą CAGE; analiza transkryptów fuzyjnych; produkcja nietypowych białek z ukrytych promotorów; badania przesiewowe nad kombinacjami leków epigenetycznych

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

KLASYFIKACJA

Organizm	Człowiek
Właściwości związane ze wzrostem	Zwolennik
Status GMO	GMO-S1

Szczegółowe informacje dotyczące statusu GMO

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.

Poziom bezpieczeństwa biologicznego	1

CECHY CHARAKTERYSTYCZNE

Morfologia	Podobny do nabłonka
Typ komórki	Komórki nabłonkowe
Czas podwojenia	ok. 24–36 godzin

IDENTYFIKATORY

Źródło

NCI-H1299-EGFP, z opornością na G418 i wyciszonym reporterem (DKFZ nr P-1045) (numer katalogowy Cytion 300272)

Numer identyfikacji podatkowej NCBI	9606
Cellosaurus	CVCL_XB25

POSTĘPOWANIE I HODOWLA

Pożywka hodowlana

RPMI 1640, w: 2,0 mM stabilnej glutaminy, w: 2,0 g/L NaHCO3 (numer artykułu Cytion 820700a)

Atmosfera inkubacyjna	37°C, 5%CO2, nawilżona atmosfera.

Suplementy

Uzupełnić podłoże 10% FBS

Odczynnik dysocjacyjny	Accutase

Hodowla komórek w subkulturze

Usuń starą pożywkę z przylegających komórek i przemyj je PBS, który nie zawiera wapnia i magnezu. W przypadku kolb T25 należy użyć 3-5 ml PBS, a w przypadku kolb T75 5-10 ml. Następnie całkowicie pokryj komórki Accutase, używając 1-2 ml dla kolb T25 i 2,5 ml dla kolb T75. Pozwól komórkom inkubować w temperaturze pokojowej przez 8-10 minut, aby je oddzielić. Po inkubacji delikatnie wymieszaj komórki z 10 ml pożywki, aby ponownie je zawiesić, a następnie odwiruj przy 300xg przez 3 minuty. Odrzucić supernatant, ponownie zawiesić komórki w świeżej pożywce i przenieść je do nowych kolb zawierających już świeżą pożywkę.

Współczynnik podziału	od 1 do 5
Gęstość wysiewu	od 1 do 3 × 10^4 komórek/cm^2
Odnawianie płynów	2 do 3 razy w tygodniu

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

Rozmrażanie i hodowla

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.

KONTROLA JAKOŚCI I KRIOKONSERWACJA

Bezpłodność

Zanieczyszczenie mykoplazmą jest wykluczane przy użyciu zarówno testów opartych na PCR, jak i metod wykrywania mykoplazmy opartych na luminescencji.
Aby upewnić się, że nie ma zanieczyszczenia bakteriami, grzybami lub drożdżami, hodowle komórkowe są poddawane codziennym kontrolom wizualnym.

Pożywka do zamrażania	Jako pożywki do kriokonserwacji używamy kompletnej pożywki wzrostowej (w tym FBS) + 10% DMSO w celu zapewnienia odpowiedniej żywotności po rozmrożeniu lub CM-1 (numer katalogowy Cytion 800100), która zawiera zoptymalizowane osmoprotektanty i stabilizatory metaboliczne w celu zwiększenia regeneracji i zmniejszenia stresu wywołanego kriokonserwacją.

Warunki przechowywania

W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiolki w ciekłym azocie w fazie lotnej w temperaturze od -150 do -196 °C.
Przechowywanie w temperaturze -80 °C jest dopuszczalne tylko jako krótki etap przejściowy przed przeniesieniem do ciekłego azotu.

Warunki wysyłki

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiolki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

KWESTIE PRAWNE I BEZPIECZEŃSTWO

Środki bezpieczeństwa

Planując przechowywanie kriofiolek w ciekłym azocie w celu ich późniejszego rozmrożenia, należy bezwzględnie przestrzegać rygorystycznych środków bezpieczeństwa. Niezbędne są odpowiednie rękawice i odzież ochronna, a podczas przenoszenia zamrożonych próbek do lub ze zbiornika z ciekłym azotem wymagane jest stosowanie maski lub okularów ochronnych. Ma to na celu zmniejszenie ryzyka obrażeń spowodowanych potencjalnymi eksplozjami kriowialu podczas wyjmowania, które mogą skutkować wyrzuceniem ostrych fragmentów.

Gwarancja

W Cytion gwarantujemy jakość i żywotność naszych produktów.
Gwarantujemy, że nasze komórki będą żywotne na początku hodowli przez 60 dni po wysyłce z naszych zakładów.
Zapewniamy, że wszystkie materiały są zgodne ze specyfikacjami opisanymi w certyfikacie analizy i/lub karcie produktu
Szczegółowe informacje można znaleźć w naszej <a href=""/Who-we-are/Warranty/"" hreflang=""x-default"">Oświadczeniu gwarancyjnym

Obowiązują umowy z podmiotami zewnętrznymi	Yes