Células NCI-H1299-RFP

300272

As células NCI-H1299 RFP, modificadas para incluir um repórter no gene DAPK1, não só são úteis para estudar a ativação de genes específicos, como também permitem uma compreensão mais ampla da forma como as células reagem globalmente aos fármacos epigenéticos. Utilizando uma técnica chamada Cap Analysis of Gene Expression (CAGE), os investigadores conseguiram detalhar as alterações no local onde a transcrição começa no genoma em resposta a tratamentos com DNMTi (DAC), HDACi (SAHA ou SB939), ou as suas combinações. Este método revela não só a reativação esperada do gene DAPK1, mas também o aparecimento de novos locais de início da transcrição, denominados TSSs não anotados induzidos pelo tratamento (TINATs), especialmente sob tratamento medicamentoso. Estes novos locais de início estão normalmente localizados em regiões do genoma que não produzem proteínas e conduzem à criação de novas moléculas de ARN que podem potencialmente codificar proteínas.
Uma análise mais aprofundada mostra que estas novas moléculas de ARN podem, por vezes, fundir-se com outras já existentes, formando o que se designa por transcritos de fusão TINAT-exão. Dependendo da forma como estas transcrições são emendadas, podem traduzir-se em novas proteínas atípicas. Este processo foi confirmado através de técnicas laboratoriais que demonstram que estas transcrições podem efetivamente levar à produção de novas formas proteicas. Estas proteínas podem interagir de forma anormal no interior da célula ou ser reconhecidas como estranhas pelo sistema imunitário, oferecendo potencialmente novos alvos para a terapia do cancro.
A ativação destes TINATs envolve alterações intrincadas tanto na metilação do ADN como nas modificações das histonas, ilustrando uma interação complexa entre estes factores epigenéticos sob tratamento medicamentoso. Em particular, o uso combinado de DAC e SB939 mostra um efeito maior, aumentando a expressão desses novos transcritos mais do que quando qualquer um dos medicamentos é usado sozinho. A compreensão destas interações e dos seus resultados ajuda a clarificar a forma como as terapias epigenéticas alteram o comportamento das células e abre possibilidades para novos tratamentos contra o cancro que potenciem estas complexas alterações moleculares.

INFORMAÇÕES GERAIS

Descrição

As células NCI-H1299 RFP, modificadas para incluir um repórter no gene DAPK1, não só são úteis para estudar a ativação de genes específicos, como também permitem uma compreensão mais ampla da forma como as células reagem globalmente aos fármacos epigenéticos. Utilizando uma técnica chamada Cap Analysis of Gene Expression (CAGE), os investigadores conseguiram detalhar as alterações no local onde a transcrição começa no genoma em resposta a tratamentos com DNMTi (DAC), HDACi (SAHA ou SB939), ou as suas combinações. Este método revela não só a reativação esperada do gene DAPK1, mas também o aparecimento de novos locais de início da transcrição, denominados TSSs não anotados induzidos pelo tratamento (TINATs), especialmente sob tratamento medicamentoso. Estes novos locais de início estão normalmente localizados em regiões do genoma que não produzem proteínas e conduzem à criação de novas moléculas de ARN que podem potencialmente codificar proteínas.
Uma análise mais aprofundada mostra que estas novas moléculas de ARN podem, por vezes, fundir-se com outras já existentes, formando o que se designa por transcritos de fusão TINAT-exão. Dependendo da forma como estas transcrições são emendadas, podem traduzir-se em novas proteínas atípicas. Este processo foi confirmado através de técnicas laboratoriais que demonstram que estas transcrições podem efetivamente levar à produção de novas formas proteicas. Estas proteínas podem interagir de forma anormal no interior da célula ou ser reconhecidas como estranhas pelo sistema imunitário, oferecendo potencialmente novos alvos para a terapia do cancro.
A ativação destes TINATs envolve alterações intrincadas tanto na metilação do ADN como nas modificações das histonas, ilustrando uma interação complexa entre estes factores epigenéticos sob tratamento medicamentoso. Em particular, o uso combinado de DAC e SB939 mostra um efeito maior, aumentando a expressão desses novos transcritos mais do que quando qualquer um dos medicamentos é usado sozinho. A compreensão destas interações e dos seus resultados ajuda a clarificar a forma como as terapias epigenéticas alteram o comportamento das células e abre possibilidades para novos tratamentos contra o cancro que potenciem estas complexas alterações moleculares.

Tecido	Pulmão
Doença	Carcinoma de células grandes
Local da metástase	Localização do tumor primário (pulmão)

Aplicações

Investigação em terapia epigenética; reativação do gene DAPK1; estudos sobre a resposta a fármacos DNMTi e HDACi; TSS não anotados induzidos pelo tratamento (TINATs); transcriptómica CAGE; análise de transcritos de fusão; produção de proteínas atípicas a partir de promotores crípticos; triagem de combinações de fármacos epigenéticos

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

CLASSIFICAÇÃO

Organismo	Humano
Propriedades de crescimento	Aderente
Estatuto em matéria de OGM	GMO-S1

Detalhes sobre o estatuto dos OGM

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.

Nível de biossegurança	1

CARACTERÍSTICAS

Morfologia	De tipo epitelial
Tipo de célula	Células epiteliais
Tempo de duplicação	aprox. 24 a 36 horas

IDENTIFICADORES

Referência

NCI-H1299-EGFP, com resistência ao G418 e repórter silenciado (DKFZ n.º P-1045) (número de catálogo Cytion 300272)

Número de identificação fiscal do NCBI	9606
Cellosaurus	CVCL_XB25

MANUSEAMENTO E CULTURA

Meio de cultura

RPMI 1640, com: 2,0 mM de glutamina estável, com: 2,0 g/L NaHCO3 (número de artigo Cytion 820700a)

Atmosfera de incubação	37°C, 5%CO2, atmosfera humidificada.

Suplementos

Completar o meio com 10% de FBS

Reagente de dissociação	Accutase

Subcultura

Retirar o meio antigo das células aderentes e lavá-las com PBS sem cálcio e magnésio. Nos frascos T25, utilizar 3-5 ml de PBS e nos frascos T75, 5-10 ml. Em seguida, cobrir completamente as células com Accutase, utilizando 1-2 ml para os frascos T25 e 2,5 ml para os frascos T75. Deixar as células incubar à temperatura ambiente durante 8-10 minutos para as destacar. Após a incubação, misturar suavemente as células com 10 ml de meio para as ressuspender e, em seguida, centrifugar a 300xg durante 3 minutos. Deitar fora o sobrenadante, ressuspender as células em meio fresco e transferi-las para novos frascos que já contenham meio fresco.

Rácio de divisão	1 a 5
Densidade de sementeira	1 a 3 × 10^4 células/cm^2
Renovação de fluidos	2 a 3 vezes por semana

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

Descongelamento e cultura

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.

CONTROLO DE QUALIDADE E CRIOPRESERVAÇÃO

Esterilidade

A contaminação por micoplasma é excluída utilizando ensaios baseados em PCR e métodos de deteção de micoplasma baseados em luminescência.
Para garantir que não há contaminação bacteriana, fúngica ou de leveduras, as culturas de células são sujeitas a inspecções visuais diárias.

Meio de congelação	Como meio de criopreservação, utilizamos um meio de crescimento completo (incluindo FBS) + 10% DMSO para uma viabilidade pós-descongelamento adequada, ou CM-1 (número de catálogo Cytion 800100), que inclui osmoprotectores optimizados e estabilizadores metabólicos para melhorar a recuperação e reduzir o stress induzido pela crio.

Condições de armazenamento

Para conservação a longo prazo, colocar os frascos em azoto líquido em fase de vapor a uma temperatura entre -150 e -196 °C. O armazenamento a -80 °C é aceitável apenas como um curto passo intermédio antes da transferência para azoto líquido.

Condições de envio

As linhas celulares criopreservadas são expedidas em gelo seco em embalagens validadas e isoladas com refrigerante suficiente para manter aproximadamente -78 °C durante o transporte. Aquando da receção, inspecionar imediatamente o recipiente e transferir sem demora os frascos para um local de armazenamento adequado.

ASPECTOS LEGAIS E DE SEGURANÇA

Precauções de segurança

Quando se planeia armazenar um criovial em nitrogénio líquido para descongelação futura, é obrigatório aderir a medidas de segurança rigorosas. Luvas e vestuário de proteção adequados são essenciais, e a utilização de uma máscara facial ou óculos de segurança é necessária durante a transferência de amostras congeladas para ou do tanque de nitrogénio líquido. Isto destina-se a mitigar o risco de ferimentos provocados por potenciais explosões de crioviais após a remoção, que podem resultar na projeção de fragmentos afiados.

Garantia

Na Cytion, nós garantimos a qualidade e a viabilidade de nossos produtos.
Garantimos que nossas células serão viáveis no início da cultura por 60 dias após o envio de nossas instalações.
Asseguramos que todos os materiais estão em conformidade com as especificações descritas no Certificado de Análise e/ou Folha de Produto
Para mais informações, consulte a nossa <a href=""/Who-we-are/Warranty/"" hreflang=""x-default"">Declaração de Garantia

Aplicam-se os acordos com terceiros	Yes