

Buňky SRA01-04 | 305436

Obecné informace

Description

Buněčná linie SRA01/04 je imortalizovaná linie buněk epitelu lidské čočky, která byla vyvinuta za účelem překonání omezení spojených s primárními kulturami buněk epitelu lidské čočky (HLE). Mezi tato omezení patří jejich nízká schopnost proliferace a obtížnost získání dostatečného množství buněk z čoček dárců. SRA01/04 byla odvozena z primárních HLE buněk získaných od kojenců podstupujících chirurgický zákrok z důvodu retinopatie předčasně narozených dětí. Imortalizace byla dosažena transfekcí plazmidem nesoucím gen pro velký T-antigen viru SV40 pod kontrolou promotoru RSV. Tento přístup vylučuje použití živého viru a umožňuje selekci jednotného klonu s konzistentními charakteristikami.

Buňky SRA01/04 vykazují stabilní proliferaci po dobu více než 130 pasáží s úrovní zdvojnásobení populace přibližně 3,5 na pasáž. Morfologicky si zachovávají monovrstvu s epiteliálními charakteristikami. Chromozomální analýza odhalila hypotetraploidní karyotyp, což odpovídá imortalizovanému stavu. Fenotyp izoenzymů potvrdil jejich lidský původ. Důležité je, že buněčná linie si zachovává molekulární znaky specifické pro oční čočku, včetně exprese krystalinů α A a β B a aldózoreduktázy, i když na nižší proteinové úrovni než v primárních kulturách HLE. mRNA pro oba krystaliny byla rovněž detekována pomocí RT-PCR a sekvenování potvrdilo 100% shodu s publikovanými lidskými sekvencemi. Díky tomu je SRA01/04 první zavedenou lidskou oční čočkovou buněčnou linií, u které bylo prokázáno, že exprimuje jak α A-, tak β B-krystaliny.

Kromě krystalinů exprimuje SRA01/04 také aldózoreduktázu, enzym zapojený do polyolové dráhy, která hraje důležitou roli při vzniku katarakty. Ačkoli optimální růst vyžaduje 20 % fetálního bovinního séra, buňky mohou přežít a proliferovat i při snížených hladinách séra nebo dokonce v bezsérových podmínkách, jsou-li předem připevněny k kultivačním miskám. Díky této přizpůsobivosti a stabilnímu fenotypu specifickému pro oční čočku představuje linie SRA01/04 cenný model pro studium fyziologie oční čočky, genové regulace v epitelu oční čočky a mechanismů vedoucích k tvorbě katarakty.

Organism Člověk**Tissue** Oko, oční čočka, epitel**Synonyms** SRA 01-04, HLEC-SRA 01-04, HLE-SRA-01-04, SRA01-04 (HLE), SRA 01/04, HLEC-SRA 01/04, HLE-SRA-01/04, SRA01/04 (HLE)

Charakteristika

Age 3 měsíce**Gender** Muži**Morphology** Epitelu podobné**Cell type** Oční čočka

Buňky SRA01-04 | 305436

Growth properties

Adherentní

Regulační údaje

Citation

SRA01-04 (katalogové číslo Cytion 305436)

Biosafety level

1

NCBI_TaxID

9606

CellosaurusAccession

CVCL_7157

GMO Status

GMO-S1: Tato lidská epiteliální buněčná linie oční čočky SRA01-04 obsahuje konstrukt velkého T-antigenu viru SV40, který umožňuje výzkum oční čočky. Tato klasifikace platí pouze v Německu a v jiných zemích se může lišit.

Biomolekulární data

Protein expression

Genetická integrace: Metoda = transfekce; Gen = UniProtKB; P03070; velký T-antigen SV40

Isoenzymes

LD, NP

Zpracování

Culture Medium

DMEM, w: 4,5 g/l glukózy, w: 4 mM L-glutaminu, w: 3,7 g/l NaHCO₃, w: 1,0 mM pyruvátu sodného (číslo výrobku Cytion 820300a)

Supplements

Doplňte médium o 20 % FBS

Dissociation Reagent

Accutase

Seeding density

 $2-4 \cdot 10^4 / \text{cm}^2$

Fluid renewal

2krát týdně

Buňky SRA01-04 | 305436

Freeze medium

Jako kryokonzervační médium používáme kompletní růstové médium (včetně FBS) + 10 % DMSO pro zajištění dostatečné životaschopnosti po rozmrazení nebo CM-1 (katalogové číslo 800100 společnosti Cytion), které obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory pro zlepšení regenerace a snížení stresu způsobeného kryo.

Thawing and Culturing Cells

1. Ověřte si, že lahvička zůstane při dodání hluboce zmrazená, protože buňky se přepravují na suchém ledu, aby se během přepravy udržely optimální teploty.
2. Po obdržení kryovialku buď okamžitě uložte při teplotě nižší než -150 °C, abyste zajistili zachování buněčné integrity, nebo přejděte ke kroku 3, pokud je nutná okamžitá kultivace.
3. Pro okamžitou kultivaci rychle rozmrazte lahvičku ponořením do vodní lázně o teplotě 37 °C s čistou vodou a antimikrobiálním prostředkem a jemně ji míchejte po dobu 40-60 sekund, dokud nezůstane malý ledový chuchvalec.
4. Všechny další kroky provádějte za sterilních podmínek v průtokové digestoři a před otevřením kryovialku dezinfikujte 70% ethanolem.
5. Opatrně otevřete dezinfikovanou lahvičku a přeneste buněčnou suspenzi do 15 ml centrifugační zkumavky obsahující 8 ml kultivačního média o pokojové teplotě a jemně promíchejte.
6. Směs odstředíte při 300 x g po dobu 3 minut, aby se buňky oddělily, a supernatant obsahující zbytky mrazicího média opatrně zlikvidujete.
7. Pelety buněk jemně resuspendujte v 10 ml čerstvého kultivačního média. U adherentních buněk rozdělíte suspenzi mezi dvě kultivační baňky T25; u suspenzních kultur přeneste veškeré médium do jedné baňky T25, abyste podpořili účinnou interakci a růst buněk.
8. Dodržujte zavedené subkultivační protokoly pro kontinuální růst a udržování buněčné linie, čímž zajistíte spolehlivé výsledky experimentů.

Incubation Atmosphere

37 °C, 5 % CO_2 , zvlhčená atmosféra.

Shipping Conditions

Kryokonzervované buněčné linie se přepravují na suchém ledu v ověřených, izolovaných obalech s dostatečným množstvím chladiva, aby se po celou dobu přepravy udržovala teplota přibližně -78 °C. Po obdržení ihned zkontrolujte obal a neprodleně přeneste lahvičky do vhodného skladu.

Buňky SRA01-04 | 305436

Storage Conditions

Pro dlouhodobé uchování umístěte lahvičky do kapalného dusíku v plynné fázi při teplotě přibližně -150 až -196 °C. Skladování při -80 °C je přijatelné pouze jako krátký přechodný krok před přemístěním do kapalného dusíku.

Kontrola kvality a molekulární analýza

Sterility

Kontaminace mykoplazmaty je vyloučena jak pomocí testů založených na PCR, tak pomocí luminiscenčních metod detekce mykoplazmy.

Aby se zajistilo, že nedojde ke kontaminaci bakteriemi, plísněmi nebo kvasinkami, jsou buněčné kultury denně podrobovány vizuální kontrolám.