

E11 Buňky | 400494**Obecné informace****Description**

Buněčná linie E11 je vysoce specializovaná myší buněčná linie vyvinutá pro pokročilé studie funkce podocyty a mechanismů onemocnění ledvin. Buňky E11, odvozené z glomerulů transgenních myší, které byly upraveny tak, aby exprimovaly teplotně citlivou variantu velkého T antigenu SV40, pracují pod regulací promotoru H-2kb indukovaného IFN-g. Tento jedinečný genetický rámec usnadňuje podmíněnou proliferaci buněk v závislosti na teplotě prostředí, což je v souladu s řízenou expresí antigenu T.

Jedním z charakteristických rysů buněčné linie E11 je její fenotypová stabilita při rozsáhlém pasážování. Buňky E11 si zachovávají konzistentní expresi a buněčné vlastnosti po více než 40 pasážích, a proto se ukázaly jako neocenitelné pro dlouhodobé studie bez běžného problému fenotypového driftu, který se vyskytuje u mnoha kultivovaných buněčných linií. Tato stabilita zlepšuje jejich použití v opakovaných a dlouhodobých biologických experimentech vyžadujících konzistentní chování buněk.

Pokud jde o expresi proteinů, buněčná linie E11 vykazuje robustní profil, který je nezbytný pro studie specifické pro podocyty. Buňky důsledně exprimují nefrin, základní součást struktury štěrbinové membrány v podocytech, spolu s řadou dalších proteinů specifických pro podocyty, jako je podocin, CD2AP a synaptopodin. Tato komplexní exprese proteinů usnadňuje studium biologie podocyty v kontrolovaném prostředí in vitro, které věrně simuluje podmínky in vivo. Schopnost buněk E11 vytvářet rozsáhlé buněčné kontakty dále podtrhuje jejich vhodnost pro modelování funkcí filtrační bariéry ledvin.

Organism Myš**Tissue** Ledviny**Charakteristika****Breed/Subspecies** (CBA/Ca x C57BL/10)Tg(H2KbtsA58)**Age** Dospělí**Gender** Nespecifikováno**Cell type** Podocyty**Growth properties** Adherentní**Regulační údaje****Citation** E11 (katalogové číslo Cytion 400494)**Biosafety level** 1

E11 Buňky | 400494

NCBI_TaxID 10090

CellosaurusAccession CVCL_5737

GMO Status GMO-S1: Tato linie myších podocytů Immorto obsahuje teplotně citlivý konstrukt SV40 T-antigenu, který umožňuje podmíněnou imortalizaci. Tato klasifikace platí pouze v Německu a jinde se může lišit.

Biomolekulární data

Protein expression WT1, Lmx1b, nefrin, NEPH1, FAT, P-kadherin, CD2AP, ZO-1, podokalyxin, podoplanin, synpo, podocin, TRPC6 a GAPDH.

Zpracování

Culture Medium RPMI 1640, w: 2,0 mM stabilní glutamin, w: 2,0 g/l NaHCO₃ (číslo výrobku Cytion 820700a)

Supplements Doplněte médium o 10% FBS

Dissociation Reagent Accutase

Subculturing Odstraňte staré médium z adherovaných buněk a promyjte je PBS bez vápníku a hořčíku. Pro baňky T25 použijte 3-5 ml PBS a pro baňky T75 5-10 ml. Poté buňky zcela zakryjte přípravkem Accutase, přičemž použijte 1-2 ml pro baňky T25 a 2,5 ml pro baňky T75. Nechte buňky inkubovat při pokojové teplotě po dobu 8-10 minut, aby se oddělily. Po inkubaci jemně promíchejte buňky s 10 ml média, aby byly znovu suspendovány, a poté je odstředte při 300xg po dobu 3 minut. Supernatant vyhodte, buňky znovu rozpustěte v čerstvém médiu a přeneste je do nových baněk, které již obsahují čerstvé médium.

Split ratio Doporučuje se poměr 1:3 nebo 1:5 (při 33 stupních Celsia) V diferenciačních podmínkách, tj. při inkubaci nekonfluentních kultur při 38 stupních Celsia, se proliferace buněk zastaví během prvních dvou týdnů a ustane přibližně po čtyřech týdnech

Seeding density Naočkejte kultivační lahve s buňkami T75 v množství 1×10^4 buněk/cm² pro proces proliferace. Udržujte buňky při teplotě 33 °C / 5 % CO₂, dokud není lahev asi z 75 % konfluentní.

Fluid renewal 2 až 3krát týdně

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.

E11 Buňky | 400494

Thawing and Culturing Cells

1. Ověřte si, že lahvička zůstane při dodání hluboce zmražená, 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 odstřeďte při 300 x g po dobu 3 minut, aby se buňky oddělily, a supernatant obsahující zbytky mrazicího média opatrně zlikvidujte.
7. Pelety buněk jemně resuspendujte v 10 ml čerstvého kultivačního média. U adherentních buněk rozdělte 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

33 °C, 5 % CO_2 , zvlhčená atmosféra.

Flask Coating

Žádný

Freezing Procedure

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.

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.

E11 Buňky | 400494

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.