

Κύτταρα SRA01-04 | 305436

Γενικές πληροφορίες

Description

Η κυτταρική σειρά SRA01/04 είναι μια αθανатоποιημένη σειρά ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων του φακού, η οποία αναπτύχθηκε για να ξεπεράσει τους περιορισμούς που συνδέονται με τις πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων του φακού (HLE). Οι περιορισμοί αυτοί περιλαμβάνουν τη χαμηλή πολλαπλασιαστική τους ικανότητα και τη δυσκολία απόκτησης επαρκών ποσοτήτων κυττάρων από φακούς δοτών. Η SRA01/04 προήλθε από πρωτογενή κύτταρα HLE που ελήφθησαν από βρέφη τα οποία υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση για αμφιβληστροειδοπάθεια πρόωρων. Η αθανατοποίηση επιτεύχθηκε μέσω μεταμόλυνσης με πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο του μεγάλου T-αντιγόνου του SV40 υπό τον έλεγχο του προαγωγού RSV. Η προσέγγιση αυτή αποφεύγει τη χρήση ζωντανού ιού και επιτρέπει την επιλογή ενός ομοιόμορφου κλώνου με σταθερά χαρακτηριστικά.

Τα κύτταρα SRA01/04 παρουσιάζουν σταθερό πολλαπλασιασμό σε πάνω από 130 περάσματα, με ρυθμό διπλασιασμού του πληθυσμού περίπου 3,5 ανά πέραςμα. Μορφολογικά, διατηρούν μονοστρωματική διάταξη με επιθηλιακά χαρακτηριστικά. Η χρωμοσωμική ανάλυση αποκάλυψε έναν υποτετραπλοειδή καρυότυπο, ο οποίος συνάδει με την κατάσταση αθανατοποίησης. Ο φαινότυπος των ισοενζύμων επιβεβαίωσε την ανθρώπινη προέλευσή τους. Είναι σημαντικό ότι η κυτταρική σειρά διατηρεί μοριακά χαρακτηριστικά ειδικά για τον φακό, συμπεριλαμβανομένης της έκφρασης των κρυσταλλινών αΑ και βΒ και της αλδοζικής αναγωγής, αν και σε χαμηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης από αυτά που παρατηρούνται σε πρωτογενείς καλλιέργειες HLE. Το mRNA και για τις δύο κρυσταλλίνες ανιχνεύθηκε επίσης μέσω RT-PCR, ενώ η αλληλούχηση επιβεβαίωσε 100% ταυτότητα με δημοσιευμένες ανθρώπινες αλληλουχίες. Αυτό καθιστά την SRA01/04 την πρώτη καθιερωμένη ανθρώπινη κυτταρική σειρά φακού για την οποία έχει αποδειχθεί ότι εκφράζει τόσο τις κρυσταλλίνες αΑ όσο και τις κρυσταλλίνες βΒ.

Εκτός από την έκφραση των κρυσταλλινών, η SRA01/04 εκφράζει αλδοζοαναγωγάση, ένα ένζυμο που εμπλέκεται στη διαδρομή των πολυολών, η οποία σχετίζεται με την καταρρακτογένεση. Ενώ η βέλτιστη ανάπτυξη απαιτεί 20% εμβρυϊκό βοοειδές ορό, τα κύτταρα μπορούν να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν με μειωμένα επίπεδα ορού ή ακόμη και σε συνθήκες χωρίς ορό, εφόσον έχουν προ-προσαρτηθεί σε τρυβλία καλλιέργειας. Αυτή η προσαρμοστικότητα, σε συνδυασμό με τον σταθερό φαινότυπο τους που είναι ειδικός για τον φακό, καθιστά την SRA01/04 ένα πολύτιμο μοντέλο για τη μελέτη της φυσιολογίας του φακού, της γονιδιακής ρύθμισης στο επιθήλιο του φακού και των μηχανισμών που διέπουν τον σχηματισμό του καταρράκτη.

Organism

Ανθρώπινο

Tissue

Μάτι, φακός του ματιού, επιθήλιο

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)

Χαρακτηριστικά

Age

3 μήνες

Gender

Άντρας

Κύτταρα SRA01-04 | 305436

Morphology	Επιθηλιοειδής
Cell type	Οφθαλμικός φακός
Growth properties	Προσκολλημένο

Ρυθμιστικά δεδομένα

Citation	SRA01-04 (αριθμός καταλόγου Cytion 305436)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_7157
GMO Status	GMO-S1: Αυτή η σειρά ανθρώπινου επιθηλίου φακού SRA01-04 περιέχει ένα κατασκεύασμα του μεγάλου T-αντιγόνου του SV40, το οποίο επιτρέπει την έρευνα στον οφθαλμικό φακό. Η ταξινόμηση αυτή ισχύει μόνο στη Γερμανία και ενδέχεται να διαφέρει σε άλλες χώρες.

Βιομοριακά δεδομένα

Protein expression	Γενετική ενσωμάτωση: Μέθοδος=Μεταφορά· Γονίδιο=UniProtKB· P03070· Μεγάλο αντιγόνο T του SV40
Isoenzymes	LD, NP

Χειρισμός

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/L γλυκόζη, w: 4 mM L-γλουταμίνη, w: 3,7 g/L NaHCO ₃ , w: 1,0 mM πυρροβικό νάτριο (αριθμός άρθρου Cytion 820300a)
Supplements	Συμπληρώστε το μέσο με 20% FBS
Dissociation Reagent	Accutase
Seeding density	2-4*10 ⁴ /cm ²

Κύτταρα SRA01-04 | 305436**Fluid renewal**

2 φορές την εβδομάδα

Freeze medium

Ως μέσο κρυοσυντήρησης, χρησιμοποιούμε πλήρες μέσο ανάπτυξης (συμπεριλαμβανομένου του FBS) + 10% DMSO για επαρκή βιωσιμότητα μετά την απόψυξη, ή CM-1 (αριθμός καταλόγου Cytion 800100), το οποίο περιλαμβάνει βελτιστοποιημένα ωσμοπροστατευτικά και μεταβολικούς σταθεροποιητές για την ενίσχυση της ανάκαμψης και τη μείωση του στρες που προκαλείται από την κρυοσυντήρηση.

Thawing and Culturing Cells

1. Επιβεβαιώστε ότι το φιαλίδιο παραμένει βαθιά παγωμένο κατά την παράδοση, καθώς τα κύτταρα αποστέλλονται σε ξηρό πάγο για να διατηρούνται οι βέλτιστες θερμοκρασίες κατά τη μεταφορά.
2. Κατά την παραλαβή, είτε αποθηκεύστε το κρυοφιαλίδιο αμέσως σε θερμοκρασίες κάτω των -150°C για να διασφαλίσετε τη διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας, είτε προχωρήστε στο βήμα 3 εάν απαιτείται άμεση καλλιέργεια.
3. Για άμεση καλλιέργεια, αποψύξτε γρήγορα το φιαλίδιο βυθίζοντάς το σε υδατόλουτρο 37°C με καθαρό νερό και αντιμικροβιακό παράγοντα, αναδεύοντας απαλά για 40-60 δευτερόλεπτα μέχρι να παραμείνει ένα μικρό σβόλο πάγου.
4. Εκτελέστε όλα τα επόμενα βήματα υπό αποστειρωμένες συνθήκες σε απορροφητήρα ροής, απολυμαίνοντας το κρυοφιαλίδιο με 70% αιθανόλη πριν από το άνοιγμα.
5. Ανοίξτε προσεκτικά το απολυμασμένο φιαλίδιο και μεταφέρετε το εναιώρημα των κυττάρων σε ένα σωληνάριο φυγοκέντρωσης των 15 ml που περιέχει 8 ml θρεπτικού μέσου καλλιέργειας σε θερμοκρασία δωματίου, αναμειγνύοντας απαλά.
6. Φυγοκεντρίστε το μείγμα στα $300 \times g$ για 3 λεπτά για να διαχωριστούν τα κύτταρα και απορρίψτε προσεκτικά το υπερκείμενο που περιέχει το υπόλοιπο μέσο κατάψυξης.
7. Επανασυσσωματώστε απαλά το κυτταρικό σφαιρίδιο σε 10 ml φρέσκου μέσου καλλιέργειας. Για προσκολλημένα κύτταρα, μοιράστε το εναιώρημα σε δύο φιάλες καλλιέργειας T25- για καλλιέργειες εναιωρήματος, μεταφέρετε όλο το μέσο σε μία φιάλη T25 για να προωθήσετε την αποτελεσματική αλληλεπίδραση και ανάπτυξη των κυττάρων.
8. Τηρείτε τα καθιερωμένα πρωτόκολλα υποκαλλιέργειας για τη συνεχή ανάπτυξη και διατήρηση της κυτταρικής σειράς, εξασφαλίζοντας αξιόπιστα πειραματικά αποτελέσματα.

Incubation Atmosphere 37°C , 5% CO_2 , υγραποιημένη ατμόσφαιρα.

Κύτταρα SRA01-04 | 305436

Shipping Conditions

Οι κρυοσυντηρημένες κυτταρικές σειρές αποστέλλονται σε ξηρό πάγο σε επικυρωμένη, μονωμένη συσκευασία με επαρκές ψυκτικό μέσο για τη διατήρηση περίπου των -78°C καθ' όλη τη διάρκεια της μεταφοράς. Κατά την παραλαβή, επιθεωρήστε αμέσως τον περιέκτη και μεταφέρετε τα φιαλίδια χωρίς καθυστέρηση στην κατάλληλη αποθήκη.

Storage Conditions

Για μακροχρόνια συντήρηση, τοποθετήστε τα φιαλίδια σε υγρό άζωτο σε φάση ατμών σε θερμοκρασία περίπου -150 έως -196°C . Η αποθήκευση στους -80°C είναι αποδεκτή μόνο ως σύντομο ενδιάμεσο βήμα πριν από τη μεταφορά σε υγρό άζωτο.

Έλεγχος ποιότητας και μοριακή ανάλυση

Sterility

Η μόλυνση από μυκόπλασμα αποκλείεται με τη χρήση τόσο των δοκιμασιών που βασίζονται στην PCR όσο και των μεθόδων ανίχνευσης μυκοπλάσματος με βάση τη φωταύγεια.

Για να διασφαλιστεί ότι δεν υπάρχει μόλυνση από βακτήρια, μύκητες ή ζύμες, οι κυτταροκαλλιέργειες υποβάλλονται σε καθημερινές οπτικές επιθεωρήσεις.