

SRA01-04 rakud | 305436

Üldine teave

Description

Rakuliin SRA01/04 on immortaliseeritud inimese silmaläätse epiteelirakuliin, mis on välja töötatud selleks, et ületada inimese silmaläätse epiteelirakkude (HLE) primaarkultuuridega seotud piiranguid. Nende piirangute hulka kuuluvad rakkude madal proliferatsioonivõime ning raskused piisava koguse rakkude saamisel doonorite silmaläätseist. SRA01/04 on saadud esmaste HLE-rakkudest, mis on võetud enneaegsete imikute silmast, kellel tehti operatsioon enneaegsete laste retinopaatia tõttu. Immortaliseerimine saavutati transfektsiooniga plasmiidiga, mis kandis RSV-promootori kontrolli all olevat SV40 suure T-antigeeni geeni. Selline lähenemine võimaldab vältida elusviiruse kasutamist ja valida välja ühtlaseid omadusi omava ühtse klooni.

SRA01/04 rakud näitavad stabiilset proliferatsiooni üle 130 passaaži, kus populatsiooni kahekordistumise tase on ligikaudu 3,5 passaaži kohta. Morfoloogiliselt säilitavad need epiteelile omaseid omadusi omava monokihi. Kromosoomianalüüs näitas hüpotetraploidset kariotüüpi, mis on kooskõlas immortaliseeritud staatusega. Isoensüümi fenotüüp kinnitas nende inimese päritolu. Oluline on, et rakuliin säilitab silmaläätse-spetsiifilised molekulaarsed omadused, sealhulgas α A- ja β B-kristalliinide ning aldose-reduktaasi ekspressiooni, kuigi valkude tasemed on madalamad kui esmaste HLE-kultuuride puhul. Mõlema kristalliini mRNA tuvastati ka RT-PCR-i abil ning sekveneerimine kinnitas 100% identiteeti avaldatud inimese järjestustega. See teeb SRA01/04-st esimese kindlaksmääratud inimese läätserakuliini, millel on näidatud nii α A- kui ka β B-kristalliinide ekspressiooni.

Lisaks kristalliinide ekspressioonile ekspresseerib SRA01/04 aldose-reduktaasi – ensüümi, mis osaleb polüoolide sünteesi rajas, mis on seotud katarakti tekkega. Kuigi optimaalseks kasvuks on vaja 20% loote veise seerumit, suudavad rakud ellu jääda ja paljuneda ka madalama seerumisisaldusega või isegi seerumivabas keskkonnas, kui need on eelnevalt kultuurikaussidele kinnitunud. See kohanemisvõime koos stabiilse läätse spetsiifilise fenotüübiga teeb SRA01/04-st väärtusliku mudeli läätse füsioloogia, läätse epiteeli geeniregulatsiooni ja katarakti tekke aluseks olevate mehhanismide uurimiseks.

Organism

Inimene

Tissue

Silm, silmaläätis, epiteel

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)

Omadused

Age

3 kuud

Gender

Mees

Morphology

Epiteelilaadsed

Cell type

Silmaläätis

SRA01-04 rakud | 305436

Growth properties	Kinnipeetav
--------------------------	-------------

Regulatiivsed andmed

Citation	SRA01-04 (Cytioni katalooginumber 305436)
-----------------	---

Biosafety level	1
------------------------	---

NCBI_TaxID	9606
-------------------	------

CellosaurusAccession	CVCL_7157
-----------------------------	-----------

GMO Status	GMO-S1: See SRA01-04 inimese silmaläätse epiteelirakkude liin sisaldab SV40 suure T-antigeeni konstrukti, mis võimaldab silmaläätse uuringuid. See klassifikatsioon kehtib ainult Saksamaal ja võib mujal erineda.
-------------------	--

Biomolekulaarsed andmed

Protein expression	Geneetiline integratsioon: meetod = transfektsioon; geen = UniProtKB; P03070; SV40 suur T-antigeen
---------------------------	--

Isoenzymes	LD, NP
-------------------	--------

Töötlemine

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/L glükoosi, w: 4 mM L-glutamiini, w: 3,7 g/L NaHCO ₃ , w: 1,0 mM naatriumpüruvaati (Cytioni artikli number 820300a)
-----------------------	---

Supplements	Täiendada keskkonda 20% FBS-ga
--------------------	--------------------------------

Dissociation Reagent	Accutase
-----------------------------	----------

Seeding density	2-4*10 ⁴ /cm ²
------------------------	--------------------------------------

Fluid renewal	2 korda nädalas
----------------------	-----------------

Freeze medium	Krüsäilitusvedelikusena kasutame täielikku kasvukeskkonda (sh FBS) + 10% DMSO, et tagada piisav elujõulisus pärast sulatamist, või CM-1 (Cytioni katalooginumber 800100), mis sisaldab optimeeritud osmoprotektante ja metaboolseid stabilisaatoreid, et parandada taastumist ja vähendada krüostressi.
----------------------	---

SRA01-04 rakud | 305436

Thawing and Culturing Cells

1. Veenduge, et vial jääb tarnimisel sügavkülmutatud, sest rakud transporditakse kuiva jääga, et säilitada optimaalne temperatuur transpordi ajal.
2. Pärast kättesaamist säilitage krüoviaal kas kohe temperatuuril alla -150 °C, et tagada rakkude terviklikkuse säilimine, või jätkake sammuga 3, kui on vaja koheselt kultiveerida.
3. Kohese kultiveerimise korral sulatage vial kiiresti, kastes selle 37 °C veevanni puhta vee ja antimikroobse ainega, segades seda õrnalt 40-60 sekundit, kuni alles jääb väike jääklomp.
4. Tehke kõik järgmised toimingud steriilsetes tingimustes vooluhoodis, desinfitseerides krüoviaal enne avamist 70% etanooliga.
5. Avage desinfitseeritud vial ettevaatlikult ja viige rakususpensioon ettevaatlikult segades 15 ml tsentrifuugitorusse, mis sisaldab 8 ml toatemperatuuril olevat kasvukeskkonda.
6. Rakkude eraldamiseks tsentrifuugige segu 300 x g juures 3 minutit ja visake ülejäänud külmutusvedelikku sisaldav supernatant ettevaatlikult ära.
7. Resuspendeerige rakupellet ettevaatlikult 10 ml värskes kasvukeskkonnas. Adhereerivate rakkude puhul jagage suspensioon kahe T25 kultuurkolvi vahel; suspensioonikultuuride puhul kandke kogu söötme keskkond ühte T25 kolbi, et soodustada rakkude tõhusat koostoimet ja kasvu.
8. Järgige kehtestatud subkultuuriprotokolle rakuliini jätkuvaks kasvuks ja säilitamiseks, tagades usaldusväärsed katsetulemused.

Incubation Atmosphere

37°C, 5% CO_2 , niisutatud atmosfäär.

Shipping Conditions

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu -78 °C. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige vialid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

Storage Conditions

Pikaajaliseks säilitamiseks asetage vialid aurufaasis vedela lämmastikuga umbes -150 kuni -196 °C juures. Säilitamine temperatuuril -80 °C on vastuvõetav ainult lühikese vaheetapina enne vedela lämmastikuga üleviimist.

Kvaliteedikontroll ja molekulaaranalüüs

SRA01-04 rakud | 305436

Sterility

Mükoplasmaakontaminatsioon on välistatud nii PCR-põhiste analüüside kui ka luminesentsil põhinevate mükoplasma tuvastamise meetodite abil.

Bakteriaalse, seene- või pärmsaaste puudumise tagamiseks kontrollitakse rakukultuure iga päev visuaalselt.