

SRA01-04-solut | 305436

Yleisiä tietoja

Description

SRA01/04-solulinja on ikuistettu ihmisen mykiön epiteelisolulinja, joka on kehitetty ihmisen mykiön epiteelisolujen (HLE) primaariviljelmien rajoitusten voittamiseksi. Näihin rajoituksiin kuuluvat solujen heikko lisääntymiskyky sekä vaikeus saada riittävä määrä soluja luovuttajien mykiöistä. SRA01/04 on johdettu primaarisista HLE-soluista, jotka on saatu ennen aikaisen retinopatian vuoksi leikkaukseen joutuneilta vauvoilta. Ikuistaminen saavutettiin transfektioilla, jossa käytettiin plasmidiä, joka kantoi SV40-viruksen suurta T-antigeenigeeniä RSV-promootorin ohjauksessa. Tämä menetelmä välttää elävän viruksen käytön ja mahdollistaa yhdenmukaisilla ominaisuuksilla varustetun klonin valinnan.

SRA01/04-solut lisääntyvät vakaasti yli 130 sukupolven ajan, ja populaation kaksinkertaistumistaso on noin 3,5 sukupolvea kohti. Morfologisesti ne säilyttävät epiteelille ominaisen yksikerroksisen rakenteen. Kromosomianalyysi paljasti hypotetraploidisen karyotyypin, mikä on sopusoinnussa ikuistuneen tilan kanssa. Isoentsyymifenotyyppi vahvisti solujen ihmisperäisyyden. Tärkeää on, että solulinja säilyttää mykiöspesifiset molekyyliset ominaisuudet, mukaan lukien α A- ja β B-kristalliinien sekä aldoosireduktaasin ilmentymisen, vaikkakin alhaisemmilla proteiinitasoilla kuin primaarisissa HLE-tiljelmissä. Molempien kristalliinien mRNA havaittiin myös RT-PCR:n avulla, ja sekvensointi vahvisti 100-prosenttisen identiteetin julkaistujen ihmisen sekvenssien kanssa. Tämä tekee SRA01/04:stä ensimmäisen vakiintuneen ihmisen mykiösolulinjan, jonka on osoitettu ilmentävän sekä α A- että β B-kristallineja.

Krystalliinien ilmentymisen lisäksi SRA01/04 ilmentää aldoosireduktaasia, polyolireitissä mukana olevaa entsyymiä, jolla on merkitystä kaihiin syntyisessä. Vaikka optimaalinen kasvu vaatii 20 %:n pitoisuutta naudan sikiöseerumia, solut voivat selviytyä ja lisääntyä alennetuilla seerumipitoisuuksilla tai jopa seerumittomissa olosuhteissa, jos ne on kiinnitetty etukäteen viljelyastioihin. Tämä sopeutumiskyky yhdessä niiden vakaiden, linssikohtaisten fenotyyppien kanssa tekee SRA01/04:stä arvokkaan mallin linssin fysiologian, linssiepiteelin geenisäätelyn sekä kaihiin muodostumisen taustalla olevien mekanismien tutkimiseen.

Organism

Ihminen

Tissue

Silmä, silmän linssi, epiteeli

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)

Ominaisuudet

Age

3 kuukautta

Gender

Mies

Morphology

Epiteelin kaltainen

Cell type

Silmälinssi

SRA01-04-solut | 305436

Growth properties	Tarttuva
--------------------------	----------

Sääntelytiedot

Citation	SRA01-04 (Cytionin tuotenumero 305436)
-----------------	--

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

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

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

GMO Status	GMO-S1: Tämä SRA01-04-ihmisen mykiön epiteelisolulinja sisältää SV40-viruksen suuren T-antigeenin rakenteen, joka mahdollistaa silmän mykiötutkimuksen. Tämä luokitus koskee ainoastaan Saksaa, ja se voi olla erilainen muissa maissa.
-------------------	---

Biomolekyyli tiedot

Protein expression	Geenien integrointi: Menetelmä = transfektio; Geeni = UniProtKB; P03070; SV40:n suuri T-antigeeni
---------------------------	---

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

Käsittely

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/l glukoosia, w: 4 mM L-glutamiinia, w: 3,7 g/l NaHCO ₃ , w: 1,0 mM natriumpyruvaattia (Cytionin artikkelinumero 820300a)
-----------------------	--

Supplements	Täydennetään elatusainetta 20 %:lla FBS:llä
--------------------	---

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

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

Fluid renewal	2 kertaa viikossa
----------------------	-------------------

SRA01-04-solut | 305436**Freeze medium**

Kryosäilytysmediaa käytämme täydellistä kasvualustaa (mukaan lukien FBS) + 10 % DMSO:ta riittävän sulatuksen jälkeisen elinkelpoisuuden varmistamiseksi tai CM-1:tä (Cytionin luettelonumero 800100), joka sisältää optimoituja osmoprotektantteja ja metabolisia stabilisaattoreita, jotka parantavat elpymistä ja vähentävät kryosäilytyksen aiheuttamaa stressiä.

Thawing and Culturing Cells

1. Varmista, että injektiopullo pysyy syväjäädetyttynä toimitettaessa, sillä solut kuljetetaan kuivajäässä, jotta optimaalinen lämpötila säilyy kuljetuksen aikana.
2. Vastaanotettaessa kryopullo joko säilytetään välittömästi alle -150 °C:n lämpötilassa solujen eheyden säilyttämiseksi tai edetään vaiheeseen 3, jos tarvitaan välitöntä viljelyä.
3. Välitöntä viljelyä varten sulata injektiopullo nopeasti upottamalla se 37 °C:n vesihauteeseen, jossa on puhdasta vettä ja mikrobilääkettä, ja sekoittamalla sitä varovasti 40-60 sekunnin ajan, kunnes jäätä on jäljellä pieni jäämöhkäle.
4. Suorita kaikki seuraavat vaiheet steriileissä olosuhteissa virtaushupussa ja desinfioi kryopullo 70-prosenttisella etanolilla ennen avaamista.
5. Avaa desinfioitu injektiopullo varovasti ja siirrä solususpensio 15 ml:n sentrifugiputkeen, joka sisältää 8 ml huoneenlämpöistä elatusainetta, varovasti sekoittaen.
6. Sentrifugoi seosta 300 x g:n voimakkuudella 3 minuutin ajan solujen erottamiseksi ja hävitä varovasti supernatantti, joka sisältää jäännöspakastusmediumia.
7. Suspendoidaan solupelletti varovasti uudelleen 10 ml:aan tuoretta elatusainetta. Jos solut ovat tarttuvia, jaa suspensio kahden T25-kolvin kesken; jos kyseessä ovat suspensioviljelmät, siirrä kaikki väliaine yhteen T25-kolviin solujen tehokkaan vuorovaikutuksen ja kasvun edistämiseksi.
8. Noudata vakiintuneita aliviljelyprotokollia solulinjan jatkuvan kasvun ja ylläpidon varmistamiseksi ja luotettavien kokeellisten tulosten varmistamiseksi.

Incubation Atmosphere

37 °C, 5 % CO_2 , kostutettu ilmakehä.

Shipping Conditions

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäässä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

SRA01-04-solut | 305436

**Storage
Conditions**

Pitkäaikaissäilytystä varten injektiopullot asetetaan höyryfaasissa olevaan nestemäiseen tyypeen noin -150 - -196 °C:een. Säilytys -80 °C:ssa on hyväksyttävää vain lyhyenä välivaiheena ennen siirtoa nestemäiseen tyypeen.

Laadunvalvonta ja molekyylianalyysi

Sterility

Mykoplasmakontaminaatio suljetaan pois sekä PCR-pohjaisilla määrittelyillä että luminesenssiin perustuvilla mykoplasman osoitusmenetelmillä.

Bakteeri-, sieni- tai hiivakontaminaation välttämiseksi soluviljelmät tarkastetaan päivittäin silmämääräisesti.