

E11 Solut | 400494**Yleisiä tietoja****Description**

E11-solulinja on pitkälle erikoistunut hiirisolulinja, joka on kehitetty podosyyttien toiminnan ja munuaissairauksien mekanismien kehittyneisiin tutkimuksiin. E11-solut ovat peräisin sellaisten siirtogeenisten hiirten glomeruleista, jotka on muunnettu ilmentämään SV40 large T -antigeenin lämpötilaherkkää muunnosta, ja ne toimivat IFN-g-indusoituvan H-2kb-promoottorin ohjaamina. Tämä ainutlaatuinen geneettinen kehys helpottaa solujen ehdollista lisääntymistä, joka riippuu ympäristön lämpötilasta ja vastaa T-antigeenin hallittua ilmentymistä.

Yksi E11-solulinjan erityispiirteistä on sen fenotyyppinen stabiilius laajojen passagointien aikana. E11-solut ovat säilyttäneet yhtenäisen ilmentymisen ja soluominaisuudet yli 40 passage-käytön ajan, ja ne ovat osoittautuneet korvaamattomiksi pitkäaikaistutkimuksissa ilman monissa viljellyissä solulinjoissa esiintyvää fenotyyppistä ajautumista. Tämä vakaus parantaa niiden käyttöä toistuvissa ja pitkäkestoisissa biologisissa kokeissa, jotka edellyttävät solujen johdonmukaista käyttäytymistä.

Proteiiniekspression osalta E11-solulinjalla on vankka profiili, joka on välttämätön podosyyttispesifisissä tutkimuksissa. Solut ilmentävät johdonmukaisesti nefriiniä, joka on olennainen osa podosyyttien raon kalvorakennetta, sekä useita muita podosyyttispesifisiä proteiineja, kuten podosiinia, CD2AP:tä ja synaptopodiinia. Tämä kattava proteiiniekspressio helpottaa podosyyttien biologian tutkimista kontrolloidussa in vitro -ympäristössä, joka simuloi läheisesti in vivo -olosuhteita. E11-solujen kyky muodostaa laajoja solukontakteja korostaa entisestään niiden soveltuvuutta munuaissuodatuskeen toimintojen mallintamiseen.

Organism Hiiri**Tissue** Munuaiset**Ominaisuudet****Breed/Subspecies** (CBA/Ca x C57BL/10)Tg(H2KbtsA58)**Age** Aikuiset**Gender** Määrittelemätön**Cell type** Podosyytti**Growth properties** Tarttuva**Säätelytiedot****Citation** E11 (Cytionin luettelonumero 400494)

E11 Solut | 400494

Biosafety level

1

NCBI_TaxID

10090

CellosaurusAccession

CVCL_5737

GMO Status

GMO-S1: Tämä Immorto-hiiren podosyyttilinja sisältää lämpötilaherkän SV40 T-antigeenikonstruktion, joka mahdollistaa ehdollisen kuolemattomuuden. Tämä luokitus koskee vain Saksaa, ja se voi poiketa muualla.

Biomolekyylitiedot

Protein expression

WT1, Lmx1b, nefriini, NEPH1, FAT, P-kadheriini, CD2AP, ZO-1, podokalyksiini, podoplaaniini, synpo, podosiini, TRPC6 ja GAPDH.

Käsittely

Culture Medium

RPMI 1640, w: 2,0 mM stabiilia glutamiinia, w: 2,0 g/L NaHCO₃ (Cytionin artikkelinumero 820700a)

Supplements

Täydennetään elatusainetta 10 %:lla FBS:llä

Dissociation Reagent

Accutase

Subculturing

Poista vanha väliaine tarttuneista soluista ja pese ne PBS:llä, josta puuttuu kalsiumia ja magnesiumia. Käytä T25-pulloissa 3-5 ml PBS:ää ja T75-pulloissa 5-10 ml. Peitä sitten solut kokonaan Accutase-valmisteella, käyttäen 1-2 ml T25-pulloissa ja 2,5 ml T75-pulloissa. Anna solujen inkuboitua huoneenlämmössä 8-10 minuuttia solujen irtoamiseksi. Inkuboinnin jälkeen solut sekoitetaan varovasti 10 ml:n väliaineella niiden resuspendoimiseksi ja sentrifugoidaan sitten 300xg:n nopeudella 3 minuutin ajan. Hävitä supernatantti, suspendoi solut uudelleen tuoreeseen väliaineeseen ja siirrä ne uusiin pulloihin, jotka sisältävät jo tuoretta väliaineita.

Seeding density

Inokuloidaan T75-soluviljelypullot 1×10^4 solua/cm²:lla proliferaatioprosessia varten. Soluja pidetään 33 celsiusasteessa / 5 % CO₂:ssa, kunnes pullo on noin 75 % konfluentti.

Fluid renewal

2-3 kertaa viikossa

Freeze medium

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

E11 Solut | 400494**Thawing and
Culturing Cells**

1. Varmista, että injektiopullo pysyy syväjäädetyttynä toimitettaessa, sillä solut kuljetetaan kuivajäädessä, 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 jäädästä 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**

33 °C, 5 % CO_2 , kostutettu ilmakehä.

Flask Coating

Ei mitään

**Freezing
Procedure**

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäädessä 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.

**Shipping
Conditions**

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäädessä 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.

E11 Solut | 400494

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.