

SRA01-04 sejtek | 305436

Általános információk

Description

Az SRA01/04 sejtvonal egy halhatatlanná tett emberi szemlencse-epiteliális sejtvonal, amelyet az emberi szemlencse-epiteliális (HLE) sejtek elsődleges tenyésztésével kapcsolatos korlátok leküzdése érdekében fejlesztettek ki. Ezek a korlátok közé tartozik a sejtek alacsony szaporodási képessége, valamint az, hogy nehéz elegendő mennyiségű sejtet nyerni a donorok szemlencséiből. Az SRA01/04-et koraszülött retinopátiája miatt műtéten átesett csecsemőktől nyert primer HLE-sejtekből állították elő. Az immortalizálást az RSV-promóter szabályozása alatt álló, az SV40 nagy T-antigén gént hordozó plazmid transzfekciójával érték el. Ez a módszer elkerüli az élő vírusok használatát, és lehetővé teszi egy egységes, állandó jellemzőkkel rendelkező klón szelekcióját.

Az SRA01/04 sejtek 130 passzázon át stabil proliferációt mutatnak, a populáció megduplázódási szintje passzázonként körülbelül 3,5. Morfológiailag epitheliális jellemzőkkel rendelkező monoréteget tartanak fenn. A kromoszómális elemzés hipotetraploid kariotípust tárt fel, ami összhangban áll az immortalizált állapottal. Az izoenzim-fenotípus megerősítette emberi eredetüket. Fontos kiemelni, hogy a sejtvonal megőrzi a lencse-specifikus molekuláris jellemzőket, beleértve az α A- és β B-kristallinok, valamint az aldóz-reduktáz expresszióját, bár alacsonyabb fehérjeszinteken, mint az elsődleges HLE-tenyészetekben megfigyelt értékek. Mindkét kristallin mRNS-ét RT-PCR segítségével is kimutatták, és a szekvenálás 100%-os egyezést igazolt a publikált emberi szekvenciákkal. Ezzel az SRA01/04 az első olyan, emberi lencséből származó, jól jellemzett sejtvonal, amelyről kimutatták, hogy mind az α A-, mind a β B-kristallinokat expresszálja.

A kristallinok expressziója mellett az SRA01/04 expresszálja az aldóz-reduktázt is, egy olyan enzimet, amely részt vesz a poliol-útvonalban, és amely releváns a szürkehályog kialakulásában. Bár az optimális növekedéshez 20%-os borjúsérum szükséges, a sejtek csökkentett szérumszint mellett is életben maradnak és szaporodnak, sőt szérummentes körülmények között is, ha előzetesen tenyésztőedényekhez rögzítik őket. Ez az alkalmazkodóképesség, valamint a stabil, lencsespecifikus fenotípusuk miatt az SRA01/04 értékes modellnek bizonyul a lencse fiziológiájának, a lencseepitéliumban zajló génszabályozásnak, valamint a szürkehályog kialakulásának alapjául szolgáló mechanizmusok tanulmányozásához.

Organism

Emberi

Tissue

Szem, szemlencse, hám

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)

Jellemzők

Age

3 hónap

Gender

Férfi

Morphology

Epithelszerű

Cell type

Szemlencse

SRA01-04 sejtek | 305436

Growth properties

Adherent

Szabályozási adatok

Citation

SRA01-04 (Cytion katalógusszám: 305436)

Biosafety level

1

NCBI_TaxID

9606

CellosaurusAccession

CVCL_7157

GMO Status

GMO-S1: Ez az SRA01-04 emberi szemlencse-epiteliális sejtvonal egy SV40 nagy T-antigén konstrukciót tartalmaz, amely lehetővé teszi a szemlencse kutatását. Ez a besorolás kizárólag Németország területén érvényes, más országokban eltérő lehet.

Biomolekuláris adatok

Protein expression

Genetikai integráció: Módszer=transzfekció; Gén=UniProtKB; P03070; SV40 nagy T-antigén

Isoenzymes

LD, NP

A kezelése

Culture Medium

DMEM, w: 4,5 g/L glükóz, w: 4 mM L-Glutamin, w: 3,7 g/L NaHCO₃, w: 1,0 mM nátrium-piruvát (Cytion cikkszám 820300a)

Supplements

A táptalajt 20% FBS-szel egészítsük ki

Dissociation Reagent

Accutase

Seeding density

 $2-4 \cdot 10^4 / \text{cm}^2$

Fluid renewal

hetente 2 alkalommal

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

Krioprezerváló táptalajként teljes növekedési táptalajt (beleértve az FBS-t) + 10% DMSO-t használunk a megfelelő kiolvasztás utáni életképesség érdekében, vagy CM-1-et (Cytion katalógusszám: 800100), amely optimalizált ozmoprotektánsokat és metabolikus stabilizátorokat tartalmaz a regenerálódás fokozása és a krio-indukált stressz csökkentése érdekében.

Thawing and Culturing Cells

1. Ellenőrizze, hogy az injekciós üveg a szállításkor mélyhűtött marad-e, mivel a sejteket szárazjégen szállítják, hogy a szállítás során az optimális hőmérsékletet fenntartsák.
2. Átvételt követően vagy azonnal tárolja a krioampullát -150°C alatti hőmérsékleten a sejtek integritásának megőrzése érdekében, vagy folytassa a 3. lépéssel, ha azonnali tenyésztésre van szükség.
3. Azonnali tenyésztés esetén gyorsan fel kell olvasztani az injekciós üveget úgy, hogy tiszta vízzel és antimikrobiális szerrel ellátott 37°C -os vízfürdőbe merítjük, és 40-60 másodpercig óvatosan kevergetjük, amíg egy kis jégcsomó nem marad.
4. Az összes további lépést steril körülmények között, áramlásos elszívóban végezzük el, és nyitás előtt fertőtlenítjük a krioüklét 70%-os etanollal.
5. Óvatosan nyissa fel a fertőtlenített fiolát, és a sejtszuspenziót óvatosan összekeverve helyezze át egy 15 ml-es centrifugacsőbe, amely 8 ml szobahőmérsékletű táptalajt tartalmaz.
6. Centrifugáljuk az elegyet $300 \times g$ -n 3 percig a sejtek szétválasztásához, és óvatosan dobjuk el a maradék fagyasztóközeget tartalmazó felülúszót.
7. Óvatosan szuszpendáljuk újra a sejtpelletet 10 ml friss táptalajban. Adhezív sejtek esetében ossza a szuszpenziót két T25-ös tenyésztőlombik között; szuszpenziós kultúrák esetében az összes tápfolyadékot tegye át egy T25-ös lombikba a hatékony sejtkölcsönhatás és növekedés elősegítése érdekében.
8. A sejtvonal folyamatos növekedése és fenntartása érdekében tartsa be a megállapított szubkultúra protokollokat, biztosítva a megbízható kísérleti eredményeket.

Incubation Atmosphere

37°C , 5% CO_2 , párasított légkör.

Shipping Conditions

A kriokonzervált sejtvonalakat szárazjégen, validált, szigetelt csomagolásban szállítják, elegendő hűtőközeggel, hogy a szállítás során a hőmérsékletet körülbelül -78°C -on tartsák. Átvételkor azonnal vizsgálja meg a tárolóedényt, és haladéktalanul helyezze át az injekciós üvegeket a megfelelő tárolóhelyre.

SRA01-04 sejtek | 305436

Storage Conditions

Hosszú távú tartósítás céljából helyezze az üvegeket gőzfázisú folyékony nitrogénbe, körülbelül -150 és -196 °C közötti hőmérsékleten. A -80 °C-on történő tárolás csak rövid átmeneti lépésként fogadható el a folyékony nitrogénbe való átvitel előtt.

Minőségellenőrzés és molekuláris elemzés

Sterility

A mikoplazma-szennyeződést mind a PCR-alapú vizsgálatokkal, mind a lumineszcencia-alapú mikoplazma-kimutatási módszerekkel kizárják.

A bakteriális, gombás vagy élesztőgombás szennyeződés elkerülése érdekében a sejt kultúrákat napi vizuális ellenőrzésnek vetik alá.