

SRA01-04 ląstelės | 305436

Bendra informacija

Description

SRA01/04 ląstelių linija yra nemirtinga žmogaus lęšiuko epitelio ląstelių linija, sukurta siekiant įveikti apribojimus, susijusius su pirminėmis žmogaus lęšiuko epitelio (HLE) ląstelių kultūromis. Šie apribojimai apima mažą ląstelių proliferacijos gebą ir sunkumus gauti pakankamą ląstelių kiekį iš donorų lęšiukų. SRA01/04 buvo gauta iš pirminių HLE ląstelių, paimtų iš naujagimių, kuriems buvo atliekama operacija dėl neišnešiotų naujagimių retinopatijos. Nemirtingumas buvo pasiektas transfekcijos būdu, naudojant plazmidę, kurioje yra SV40 didžiojo T antigeno genas, kontroliuojamas RSV promotoriaus. Šis metodas leidžia išvengti gyvo viruso naudojimo ir atrinkti vienodą kloną su pastoviomis savybėmis.

SRA01/04 ląstelės rodo stabilią proliferaciją per 130 pasėlių, o populiacijos padvigubėjimo lygis sudaro maždaug 3,5 per pasėlį. Morfologiškai jos išlaiko vieną sluoksnį su epitelinėmis savybėmis. Chromosomų analizė atskleidė hipotetraploidinį kariotipą, atitinkantį nemirtingą būseną. Izofermentų fenotipas patvirtino jų žmogiškąją kilmę. Svarbu pažymėti, kad ląstelių linija išlaiko lęšiui būdingas molekulinės savybes, įskaitant α A- ir β B-kristalinių bei aldozės reduktazės ekspresiją, nors baltymų lygis yra žemesnis nei pirminėse HLE kultūrose. Abiejų kristalinių mRNR taip pat buvo aptikta RT-PCR metodu, o sekvenavimas patvirtino 100 % tapatumą su paskelbtomis žmogaus sekvencijomis. Tai daro SRA01/04 pirmąją nustatytą žmogaus lęšiuko ląstelių liniją, kuri, kaip įrodyta, ekspresuoja tiek α A-, tiek β B-kristalinius.

Be kristalinių baltymų ekspresijos, SRA01/04 linija ekspresuoja aldosės reduktazę – fermentą, dalyvaujantį poliolių sintezės kelyje, kuris yra susijęs su katarakta. Nors optimaliam augimui reikalingas 20 % veršelių serumo, ląstelės gali išgyventi ir daugintis esant sumažintam serumo kiekiui arba netgi be serumo, jei jos iš anksto pritvirtintos prie kultūrinės lėkštelės. Šis prisitaikymas, kartu su stabilium, lęšiui būdingu fenotipu, daro SRA01/04 vertingą modelį lęšio fiziologijos, genų reguliacijos lęšio epitelio ląstelėse ir katarakto susidarymo mechanizmų tyrimams.

Organism Žmogus

Tissue Akių obuolys, akies lęšis, epitelis

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)

Charakteristikos

Age 3 mėnesiai

Gender Vyras

Morphology Į epitelį panašus

Cell type Akių lęšis

SRA01-04 ląstelės | 305436

Growth properties

Priguldęs

Reguliavimo duomenys

Citation

SRA01-04 (Cytion katalogo numeris 305436)

Biosafety level

1

NCBI_TaxID

9606

CellosaurusAccession

CVCL_7157

GMO Status

GMO-S1: Ši žmogaus lęšiuko epitelio ląstelių linija SRA01-04 yra modifikuota SV40 didžiojo T-antigeno konstruktu, leidžiančiu atlikti akies lęšiuko tyrimus. Ši klasifikacija galioja tik Vokietijoje ir kitose šalyse gali skirtis.

Biomolekuliniai duomenys

Protein expression

Genetinė integracija: metodas = transfekcija; genas = UniProtKB; P03070; SV40 didysis T antigenas

Isoenzymes

LD, NP

Tvarkymas

Culture Medium

DMEM, š: 4,5 g/l gliukozės, š: 4 mM L-glutamino, š: 3,7 g/l NaHCO₃, š: 1,0 mM natrio piruvato (Cytion gaminio numeris 820300a)

Supplements

Papildykite terpę 20 % FBS

Dissociation Reagent

Accutase

Seeding density

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

Fluid renewal

2 kartus per savaitę

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

Kaip kriokonservavimo terpę naudojame visišką augimo terpę (įskaitant FBS) + 10 % DMSO, kad būtų užtikrintas tinkamas gyvybingumas po atšildymo, arba CM-1 (Cytion katalogo numeris 800100), kurioje yra optimizuotų osmoprotektorių ir medžiagų apykaitos stabilizatorių, kad būtų pagerintas atsigavimas ir sumažintas kriokonservavimo sukeltas stresas.

Thawing and Culturing Cells

1. Patikrinkite, ar pristatant buteliuką jis išlieka gerai užšaldytas, nes ląstelės gabenamos ant sauso ledo, kad gabenimo metu būtų palaikoma optimali temperatūra.
2. Gavę iš karto laikykite kriovialą žemesnėje nei -150 °C temperatūroje, kad užtikrintumėte ląstelių vientisumo išsaugojimą, arba pereikite prie 3 veiksmo, jei reikia nedelsiant kultivuoti.
3. Jei norite nedelsiant pradėti kultivuoti, greitai atšildykite buteliuką panardindami jį į 37 °C temperatūros vandens vonelę su švariu vandeniu ir antimikrobine priemone, švelniai maišydami 40-60 sekundžių, kol liks nedidelis ledo gabalėlis.
4. Visus tolesnius veiksmus atlikite steriliomis sąlygomis srauto gaubte, prieš atidarydami kriovialą dezinfekuokite jį 70 % etanoliu.
5. Atsargiai atidarykite dezinfekuotą buteliuką ir perpilkite ląstelių suspensiją į 15 ml centrifugos mėgintuvėlį, kuriame yra 8 ml kambario temperatūros mitybinės terpės, atsargiai išmaišykite.
6. Mišinį centrifuguokite 300 x g greičiu 3 minutes, kad atsiskirtų ląstelės, ir atsargiai išmeskite supernatantą su šaldymo terpės likučiais.
7. Švelniai resuspenduokite ląstelių granules 10 ml šviežios mitybinės terpės. Jei ląstelės yra prigludusios, suspensiją padalykite į dvi T25 kolbas; jei tai suspensinės kultūros, visą terpę perkelkite į vieną T25 kolbą, kad paskatintumėte veiksmingą ląstelių sąveiką ir augimą.
8. Laikykitės nustatytų subkultūrų protokolų, kad ląstelių linija nuolat augtų ir būtų palaikoma, taip užtikrinant patikimus eksperimentų rezultatus.

Incubation Atmosphere

37 °C, 5 % CO_2 , drėkintoje atmosferoje.

Shipping Conditions

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug -78 °C temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelkite mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

SRA01-04 ląstelės | 305436

Storage Conditions

Norėdami ilgai saugoti, įdėkite buteliukus į garų fazės skystą azotą maždaug -150-196 °C temperatūroje.
Laikymas -80 °C temperatūroje yra priimtinas tik kaip trumpas tarpinis etapas prieš perkeliant į skystąjį azotą.

Kokybės kontrolė ir molekulinė analizė

Sterility

Mikoplazmos užterštumas atmetamas taikant PGR pagrįstus tyrimus ir liuminescencinius mikoplazmos aptikimo metodus.

Siekiant užtikrinti, kad nebūtų užteršimo bakterijomis, grybeliais ar mielėmis, ląstelių kultūros kasdien vizualiai tikrinamos.