

SRA01-04-cellen | 305436

Algemene informatie

Description

De SRA01/04-celijn is een geïmmortaliseerde menselijke lens-epitheelcelijn die is ontwikkeld om de beperkingen van primaire culturen van menselijke lens-epitheelcellen (HLE-cellen) te ondervangen. Deze beperkingen omvatten onder meer hun lage proliferatievermogen en de moeilijkheid om voldoende hoeveelheden cellen uit donorlensen te verkrijgen. SRA01/04 is afgeleid van primaire HLE-cellen die zijn verkregen van zuigelingen die een operatie ondergingen voor retinopathie bij prematuren. De onsterfelijkmaking werd bereikt door transfectie met een plasmide dat het SV40-groot-T-antigeengen draagt onder controle van de RSV-promotor. Deze aanpak vermijdt het gebruik van levend virus en maakt de selectie mogelijk van een uniforme kloon met consistente kenmerken.

SRA01/04-cellen vertonen een stabiele proliferatie gedurende 130 passages met een populatieverdubbelingsniveau van ongeveer 3,5 per passage. Morfologisch behouden ze een monolaag met epitheliale kenmerken. Chromosomale analyse bracht een hypotetraploïd karyotype aan het licht, wat overeenkomt met een onsterfelijke status. Het isozymefenotype bevestigde hun menselijke oorsprong. Belangrijk is dat de cellijn lensspecifieke moleculaire kenmerken behoudt, waaronder de expressie van α A- en β B-kristallinen en aldosereductase, zij het op lagere eiwitniveaus dan waargenomen in primaire HLE-culturen. mRNA voor beide kristallinen werd ook gedetecteerd via RT-PCR, en sequentiebepaling bevestigde 100% identiteit met gepubliceerde menselijke sequenties. Dit maakt SRA01/04 de eerste vastgestelde menselijke lenscellijn waarvan is aangetoond dat deze zowel α A- als β B-kristallinen tot expressie brengt.

Naast de expressie van kristallinen brengt SRA01/04 ook aldose-reductase tot expressie, een enzym dat betrokken is bij de polyolroute, die relevant is voor de ontwikkeling van cataract. Hoewel voor optimale groei 20% foetaal runderserum nodig is, kunnen de cellen overleven en zich vermenigvuldigen bij lagere serumconcentraties of zelfs in serumvrije omstandigheden, mits ze vooraf aan kweekschalen zijn gehecht. Dit aanpassingsvermogen, in combinatie met hun stabiele lensspecifieke fenotype, maakt SRA01/04 tot een waardevol model voor het bestuderen van de fysiologie van de lens, genregulatie in het lensepitheel en de mechanismen die ten grondslag liggen aan de vorming van cataract.

Organism

Mens

Tissue

Oog, ooglens, epitheel

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)

Kenmerken

Age

3 maanden

Gender

Mannelijk

Morphology

Epitheelachtig

Cell type

Ooglens

SRA01-04-cellen | 305436

Growth properties

Aanhangend

Regelgevende gegevens**Citation**

SRA01-04 (Cytion-catalogusnummer 305436)

Biosafety level

1

NCBI_TaxID

9606

CellosaurusAccession

CVCL_7157

GMO Status

GMO-S1: Deze SRA01-04-lijn van menselijk lens-epitheel bevat een construct van het grote T-antigeen van SV40, waarmee onderzoek naar de oog lens mogelijk wordt gemaakt. Deze classificatie geldt uitsluitend binnen Duitsland en kan elders afwijken.

Biomoleculaire gegevens**Protein expression**

Genetische integratie: Methode = Transfectie; Gen = UniProtKB; P03070; SV40 groot T-antigeen

Isoenzymes

LD, NP

Omgaan met**Culture Medium**DMEM, w: 4,5 g/L Glucose, w: 4 mM L-Glutamine, w: 3,7 g/L NaHCO₃, w: 1,0 mM Natriumpyruvaat (Cytion artikelnummer 820300a)**Supplements**

Vul het medium aan met 20% FBS

Dissociation Reagent

Accutase

Seeding density $2-4 \times 10^4 / \text{cm}^2$ **Fluid renewal**

2 keer per week

SRA01-04-cellen | 305436

Freeze medium

Als cryoconserveringsmedium gebruiken we volledig groeimeidium (inclusief FBS) + 10% DMSO voor voldoende levensvatbaarheid na het ontdooien, of CM-1 (Cytion catalogusnummer 800100), dat geoptimaliseerde osmoprotectanten en metabolische stabilisatoren bevat om het herstel te verbeteren en door cryo geïnduceerde stress te verminderen.

Thawing and Culturing Cells

1. Controleer of de flacon bij levering diepgevroren blijft, aangezien de cellen op droog ijs worden verzonden om optimale temperaturen tijdens het transport te behouden.
2. Bewaar het cryoflesje na ontvangst onmiddellijk bij temperaturen lager dan -150 °C om de integriteit van de cellen te behouden, of ga verder met stap 3 als onmiddellijke kweek vereist is.
3. Voor onmiddellijke kweek: ontdooi de flacon snel door deze onder te dompelen in een waterbad van 37 °C met schoon water en een antimicrobieel middel, waarbij u 40-60 seconden zachtjes schudt totdat er een klein ijsklontje overblijft.
4. Voer alle volgende stappen uit onder steriele omstandigheden in een stromingskap en desinfecteer de cryoflacon met 70% ethanol voordat deze wordt geopend.
5. Open voorzichtig de gedesinfecteerde flacon en breng de celsuspensie over in een centrifugebuis van 15 ml met 8 ml kweekmedium op kamertemperatuur en meng voorzichtig.
6. Centrifugeer het mengsel gedurende 3 minuten bij 300 x g om de cellen te scheiden en gooi het supernatant met resterend vriesmedium voorzichtig weg.
7. Resuspendeer de celpellet voorzichtig in 10 ml vers kweekmedium. Verdeel voor adherente cellen de suspensie over twee T25-kweekkolven; breng voor suspensiekweken al het medium over in één T25-kweekkolf om effectieve celinteractie en -groei te bevorderen.
8. Houd u aan de vastgestelde subcultuurprotocollen voor continue groei en onderhoud van de cellijn, om betrouwbare experimentele resultaten te garanderen.

Incubation Atmosphere

37°C, 5% CO_2 , bevochtigde atmosfeer.

Shipping Conditions

Gecryopreserveerde cellijnen worden verzonden op droog ijs in gevalideerde, geïsoleerde verpakkingen met voldoende koelmiddel om gedurende het transport ongeveer -78 °C te handhaven. Inspecteer de verpakking onmiddellijk na ontvangst en breng de flacons onverwijld over naar de juiste opslagplaats.

SRA01-04-cellen | 305436

Storage Conditions

Voor langdurige bewaring plaatst u flesjes in vloeibare stikstof in dampfase bij ongeveer -150 tot -196 °C. Opslag bij -80 °C is alleen aanvaardbaar als korte tussenstap vóór overbrenging naar vloeibare stikstof.

Kwaliteitscontrole en moleculaire analyse

Sterility

Mycoplasmaverontreiniging wordt uitgesloten met zowel PCR-gebaseerde testen als op luminescentie gebaseerde mycoplasmadetectiemethoden.

Om er zeker van te zijn dat er geen besmetting is met bacteriën, schimmels of gisten, worden de celculturen dagelijks onderworpen aan visuele inspecties.