

E11 Celler | 400494**Generell informasjon****Description**

E11-cellelinjen er en høyspesialisert murin cellelinje som er utviklet for avanserte studier av podocyttfunksjon og mekanismer ved nyresykdom. E11-cellene stammer fra glomeruli fra transgene mus som er konstruert for å uttrykke en temperatursensitiv variant av SV40 large T-antigenet, og de reguleres av den IFN-g-induserbare H-2kb-promotoren. Dette unike genetiske rammeverket legger til rette for betinget spredning av cellene, avhengig av omgivelsestemperaturen, noe som samsvarer med det kontrollerte uttrykket av T-antigenet.

Et av de viktigste kjennetegnene ved E11-cellelinjen er dens fenotypiske stabilitet gjennom omfattende passering. E11-celler har opprettholdt et konsistent uttrykk og cellulære egenskaper gjennom mer enn 40 passeringer, noe som har vist seg å være uvurderlig for langtidsstudier uten det vanlige problemet med fenotypisk drift som man ser i mange dyrkede cellelinjer. Denne stabiliteten gjør at de kan brukes i gjentatte og langvarige biologiske eksperimenter som krever konsistent celleatferd.

Når det gjelder proteinuttrykk, har E11-cellelinjen en robust profil som er helt avgjørende for podocyttspesifikke studier. Cellene uttrykker konsekvent nefrin, som er en viktig komponent i podocyttenes spaltestruktur, sammen med en rekke andre podocyttspesifikke proteiner som podocin, CD2AP og synaptopodin. Dette omfattende proteinuttrykket gjør det mulig å studere podocyttenes biologi i et kontrollert in vitro-miljø, som i stor grad etterligner in vivo-forhold. E11-cellenes evne til å danne omfattende celle-celle-kontakter understreker ytterligere deres egnethet for modellering av nyrenes filtreringsbarrierefunksjoner.

Organism Mus**Tissue** Nyre**Kjennetegn****Breed/Subspecies** (CBA/Ca x C57BL/10)Tg(H2KbtsA58)**Age** Voksen**Gender** Uspesifisert**Cell type** Podocytt**Growth properties** Vedhengende**Regulatoriske data****Citation** E11 (Cytion-katalognummer 400494)**Biosafety level** 1

E11 Celler | 400494**NCBI_TaxID** 10090**CellosaurusAccession** CVCL_5737**GMO Status** GMO-S1: Denne Immorto-podocytlinjen fra mus inneholder en temperaturfølsom SV40 T-antigenkonstruksjon som muliggjør betinget udødeliggjøring. Denne klassifiseringen gjelder bare i Tyskland og kan variere andre steder.**Biomolekylære data****Protein expression** WT1, Lmx1b, nefrin, NEPH1, FAT, P-cadherin, CD2AP, ZO-1, podocalyxin, podoplanin, synpo, podocin, TRPC6 og GAPDH.**Håndtering****Culture Medium** RPMI 1640, m: 2,0 mM stabil glutamin, m: 2,0 g/L NaHCO₃ (Cytion artikkelnummer 820700a)**Supplements** Suppler mediet med 10 % FBS**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Fjern det gamle mediet fra de adherente cellene, og vask dem med PBS uten kalsium og magnesium. Bruk 3-5 ml PBS for T25-kolber og 5-10 ml for T75-kolber. Dekk deretter cellene helt med Accutase, med 1-2 ml for T25-kolber og 2,5 ml for T75-kolber. La cellene inkubere i romtemperatur i 8-10 minutter for å løsne dem. Etter inkubasjon blandes cellene forsiktig med 10 ml medium for å resuspendere dem, og sentrifuger deretter ved 300xg i 3 minutter. Kast supernatanten, resuspendere cellene i nytt medium, og overfør dem til nye kolber som allerede inneholder nytt medium.**Split ratio** Et forhold på 1:3 eller 1:5 (ved 33 grader Celsius) anbefales Under differensieringsforhold, dvs. inkubering av ikke-konfluerende til konfluente kulturer ved 38 grader Celsius, opphører celleproliferasjonen i løpet av de første to ukene og stanser etter ca. fire uker**Seeding density** Inokulere T75-cellekulturflasker med 1×10^4 celler/cm² for proliferasjonsprosessen. Hold cellene ved 33 grader Celsius / 5 % CO₂, til flasken er omtrent 75 % konfluent.**Fluid renewal** 2 til 3 ganger per uke**Freeze medium** Som kryopreserveringsmedium bruker vi komplett vekstmedium (inkludert FBS) + 10 % DMSO for tilstrekkelig levedyktighet etter optiming, eller CM-1 (Cytion-katalognummer 800100), som inneholder optimaliserte osmobybeskyttende midler og metabolske stabilisatorer for å øke utvinningen og redusere kryoundusert stress.

E11 Celler | 400494

Thawing and Culturing Cells

1. Kontroller at hetteglasset er dypfrost ved levering, ettersom cellene sendes på tørris for å opprettholde optimale temperaturer under transport.
2. Ved mottak skal hetteglasset enten oppbevares umiddelbart ved temperaturer under $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ for å sikre at cellenes integritet bevares, eller gå videre til trinn 3 hvis umiddelbar dyrking er nødvendig.
3. Ved umiddelbar dyrking tiner du hetteglasset raskt ved å senke det ned i et $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ varmt vannbad med rent vann og et antimikrobielt middel, og røre forsiktig i 40-60 sekunder til det blir en liten isklump igjen.
4. Utfør alle påfølgende trinn under sterile forhold i en strømningshette, og desinfiser kryoflasken med 70 % etanol før du åpner den.
5. Åpne det desinfiserte hetteglasset forsiktig, og overfør cellesuspensjonen til et 15 ml sentrifugerør som inneholder 8 ml romtemperert dyrkningsmedium, og bland forsiktig.
6. Sentrifuger blandingen ved $300 \times g$ i 3 minutter for å separere cellene, og kast supernatanten som inneholder rester av frysemedium, forsiktig.
7. Resuspender cellepelletten forsiktig i 10 ml nytt dyrkningsmedium. For adherente celler, del suspensjonen mellom to T25-kulturkolber; for suspensjonskulturer, overfør alt mediet til én T25-kolbe for å fremme effektiv celleinteraksjon og vekst.
8. Følg etablerte subkulturprotokoller for fortsatt vekst og vedlikehold av cellelinjen, noe som sikrer pålitelige eksperimentelle resultater.

Incubation Atmosphere

$33\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , befuktet atmosfære.

Flask Coating

Ingen

Freezing Procedure

Kryopreserverte cellelinjer sendes på tørris i validert, isolert emballasje med tilstrekkelig kjølemiddel til å opprettholde en temperatur på ca. $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hele transporten. Ved mottak skal beholderen inspiseres umiddelbart, og hetteglassene skal straks overføres til egnet lagringsplass.

Shipping Conditions

Kryopreserverte cellelinjer sendes på tørris i validert, isolert emballasje med tilstrekkelig kjølemiddel til å opprettholde en temperatur på ca. $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under hele transporten. Ved mottak skal beholderen inspiseres umiddelbart, og hetteglassene skal straks overføres til egnet lagringsplass.

E11 Celler | 400494

Storage Conditions

For langtidsoppbevaring plasseres hetteglassene i flytende nitrogen i dampfase ved ca. -150 til -196 °C. Lagring ved -80 °C er kun akseptabelt som et kort mellomtrinn før overføring til flytende nitrogen.

Kvalitetskontroll / Genetisk profil / HLA

Sterility

Mykoplasma-kontaminering utelukkes ved hjelp av både PCR-baserte analyser og luminescensbaserte metoder for påvisning av mykoplasma.

For å sikre at det ikke finnes bakterie-, sopp- eller gjærkontaminering, blir cellekulturene inspisert visuelt hver dag.