

Komórki SRA01-04 | 305436

Informacje ogólne

Description

Linia komórkowa SRA01/04 to nieśmiertelna linia komórek nabłonka soczewki ludzkiej, opracowana w celu przezwyciężenia ograniczeń związanych z pierwotnymi hodowlami komórek nabłonka soczewki ludzkiej (HLE). Ograniczenia te obejmują ich niską zdolność proliferacyjną oraz trudności w uzyskaniu wystarczających ilości komórek z soczewek dawców. Linia SRA01/04 została wyhodowana z pierwotnych komórek HLE pobranych od niemowląt poddanych operacji z powodu retinopatii wcześniaków. Nieśmiertelność uzyskano poprzez transfekcję plazmidem zawierającym gen dużego antygenu T wirusa SV40 pod kontrolą promotora RSV. Podejście to pozwala uniknąć stosowania żywego wirusa i umożliwia selekcję jednolitego klonu o spójnych cechach.

Komórki SRA01/04 wykazują stabilną proliferację przez ponad 130 pasażów, przy współczynniku podwojenia populacji wynoszącym około 3,5 na pasaż. Pod względem morfologicznym zachowują one układ jednowarstwowy o cechach nabłonkowych. Analiza chromosomowa wykazała kariotyp hipotetraploidalny, zgodny ze statusem komórek nieśmiertelnych. Fenotyp izozymowy potwierdził ich ludzkie pochodzenie. Co istotne, linia komórkowa zachowuje cechy molekularne charakterystyczne dla soczewki, w tym ekspresję krystalin αA i βB oraz reduktazy aldozowej, choć na niższym poziomie białkowym niż obserwowany w pierwotnych hodowlach komórek HLE. Za pomocą RT-PCR wykryto również mRNA obu krystalin, a sekwencjonowanie potwierdziło 100-procentową identyczność z opublikowanymi sekwencjami ludzkimi. To sprawia, że SRA01/04 jest pierwszą ustanowioną ludzką linią komórkową soczewki, w której wykazano ekspresję zarówno krystalin αA , jak i βB .

Oprócz ekspresji krystalin, linia SRA01/04 wykazuje ekspresję reduktazy aldozowej – enzymu biorącego udział w szlaku poliolowym, który ma znaczenie w patogenezie zaćmy. Chociaż optymalny wzrost wymaga 20% surowicy płodowej bydlęcej, komórki mogą przetrwać i namnażać się przy obniżonym stężeniu surowicy, a nawet w warunkach bezsurowicowych, jeśli zostaną wcześniej przyłączone do naczyń hodowlanych. Ta zdolność adaptacyjna, w połączeniu ze stabilnym fenotypem specyficznym dla soczewki, sprawia, że linia SRA01/04 stanowi cenny model do badania fizjologii soczewki, regulacji genów w nabłonku soczewki oraz mechanizmów leżących u podstaw powstawania zaćmy.

Organism

Człowiek

Tissue

Oko, soczewka oka, nabłonek

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)

Charakterystyka

Age

3 miesiące

Gender

Męczyzna

Morphology

Podobny do nabłonka

Komórki SRA01-04 | 305436

Cell type	Soczewka oka
-----------	--------------

Growth properties	Adherent
-------------------	----------

Dane regulacyjne

Citation	SRA01-04 (numer katalogowy Cytion 305436)
----------	---

Biosafety level	1
-----------------	---

NCBI_TaxID	9606
------------	------

CellosaurusAccession	CVCL_7157
----------------------	-----------

GMO Status	GMO-S1: Ta ludzka linia komórkowa nabłonka soczewki SRA01-04 zawiera konstrukt dużego antygenu T wirusa SV40, umożliwiający prowadzenie badań nad soczewką oka. Klasyfikacja ta obowiązuje wyłącznie na terenie Niemiec i może różnić się w innych krajach.
------------	---

Dane biomolekularne

Protein expression	Integracja genetyczna: Metoda = transfekcja; Gen = UniProtKB; P03070; duży antygen T wirusa SV40
--------------------	--

Isoenzymes	LD, NP
------------	--------

Obsługa

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/l glukozy, w: 4 mM L-glutaminy, w: 3,7 g/l NaHCO ₃ , w: 1,0 mM pirogronianu sodu (numer artykułu Cytion 820300a)
----------------	--

Supplements	Uzupełnić podłoże 20% FBS
-------------	---------------------------

Dissociation Reagent	Accutase
----------------------	----------

Seeding density	2-4*10 ⁴ /cm ²
-----------------	--------------------------------------

Fluid renewal	2 razy w tygodniu
---------------	-------------------

Komórki SRA01-04 | 305436

Freeze medium

Jako pożywki do kriokonserwacji używamy kompletnej pożywki wzrostowej (w tym FBS) + 10% DMSO w celu zapewnienia odpowiedniej żywotności po rozmrożeniu lub CM-1 (numer katalogowy Cytion 800100), która zawiera zoptymalizowane osmoprotektanty i stabilizatory metaboliczne w celu zwiększenia regeneracji i zmniejszenia stresu wywołanego kriokonserwacją.

Thawing and Culturing Cells

1. Upewnij się, że fiolka pozostaje głęboko zamrożona w momencie dostawy, ponieważ komórki są wysyłane w suchym lodzie, aby utrzymać optymalną temperaturę podczas transportu.
2. Po otrzymaniu należy natychmiast przechowywać fiolkę w temperaturze poniżej -150°C , aby zapewnić zachowanie integralności komórek, lub przejść do kroku 3, jeśli wymagana jest natychmiastowa hodowla.
3. W przypadku natychmiastowej hodowli należy szybko rozmrozić fiolkę, zanurzając ją w łaźni wodnej o temperaturze 37°C z czystą wodą i środkiem przeciwdrobnoustrojowym, delikatnie mieszając przez 40-60 sekund, aż pozostanie niewielka grudka lodu.
4. Wykonaj wszystkie kolejne kroki w sterylnych warunkach w kapturze przepływowej, dezynfekując fiolkę 70% etanolem przed otwarciem.
5. Ostrożnie otworzyć zdezynfekowaną fiolkę i przenieść zawiesinę komórek do 15 ml probówki wirówkowej zawierającej 8 ml podłoża hodowlanego o temperaturze pokojowej, delikatnie mieszając.
6. Wirować mieszaninę z prędkością $300 \times g$ przez 3 minuty w celu oddzielenia komórek i ostrożnie odrzucić supernatant zawierający pozostałości pożywki do zamrażania.
7. Delikatnie ponownie zawiesić osad komórek w 10 ml świeżego podłoża hodowlanego. W przypadku komórek przylegających, rozdzielić zawiesinę pomiędzy dwie kolby hodowlane T25; w przypadku hodowli zawiesinowych, przenieść całą pożywkę do jednej kolby T25 w celu promowania skutecznej interakcji i wzrostu komórek.
8. Przestrzegaj ustalonych protokołów podhodowli w celu ciągłego wzrostu i utrzymania linii komórkowej, zapewniając wiarygodne wyniki eksperymentów.

Incubation Atmosphere

37°C , 5% CO_2 , nawilżona atmosfera.

Shipping Conditions

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiolki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Komórki SRA01-04 | 305436

Storage Conditions

W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiołki w ciekłym azocie w fazie lotnej w temperaturze od -150 do -196 °C. Przechowywanie w temperaturze -80 °C jest dopuszczalne tylko jako krótki etap przejściowy przed przeniesieniem do ciekłego azotu.

Kontrola jakości i analiza molekularna

Sterility

Zanieczyszczenie mykoplazmą jest wykluczane przy użyciu zarówno testów opartych na PCR, jak i metod wykrywania mykoplazmy opartych na luminescencji.

Aby upewnić się, że nie ma zanieczyszczenia bakteriami, grzybami lub drożdżami, hodowle komórkowe są poddawane codziennym kontrolom wizualnym.