

Клетки MDCK-SIAT1 | 602281

Обща информация

Description

Клетъчната линия MDCK-SIAT1 е модифицирана версия на клетките Madin-Darby Canine Kidney (MDCK), създадена да експресира по-високи нива на човешката 2,6-сиалилтрансфераза (SIAT1). Този ензим е отговорен за добавянето на сиалова киселина в алфа-2,6 връзка с галактоза върху гликопротеини и гликолипиди. Модификацията е извършена, за да се увеличи експресията на свързаните с алфа-2,6 сиалови киселини, които са основни рецептори за човешките грипни вируси. Това засилване е от решаващо значение, тъй като прави клетките MDCK-SIAT1 по-близки до човешкия епител на дихателните пътища, който естествено има висока концентрация на тези рецептори. В резултат на това тези клетки предлагат по-физиологично подходящ модел за изследване на човешките грипни вируси и техните взаимодействия с потенциални антивирусни съединения.

Едно от значимите приложения на клетките MDCK-SIAT1 е при оценката на чувствителността на грипните вируси към невраминидазни инхибитори (NAI), като например оселтамивир. Поради повишеното наличие на алфа-2,6-свързани сиалови киселини, клетките MDCK-SIAT1 демонстрират подобрена чувствителност към NAIs в сравнение с немодифицираните клетки MDCK. Това ги превръща в отличен инструмент за откриване на резистентност към тези инхибитори, особено при клинични изолати на човешки грипни вируси с нисък брой пасажи. Клетъчната линия MDCK-SIAT1 дава възможност за по-точни *in vitro* проучвания на лекарствената ефикасност и взаимодействията с вирусните рецептори, предоставяйки ценни сведения за развитието на антивирусните терапии и механизмите на резистентност.

Organism Кучешки

Tissue Бъбреци

Характеристики

Breed/Subspecies Кокер шпаньол

Age Възрастни

Gender Жена

Morphology Епителиален

Growth properties Придържащи се

Регулаторни данни

Citation MDCK-SIAT1 (каталожен номер 602281 на Cytion)

Клетки MDCK-SIAT1 | 602281

Biosafety level 2

NCBI_TaxID 9615

CellosaurusAccession CVCL_Z936

GMO Status GMO-S1: Тази клетъчна линия на кучешки епителни бъбреци (MDCK-SIAT1) съдържа рсDNA3.1GS конструкт, кодиращ човешка 2,6-сиалилтрансфераза (SIAT1), което позволява експресия на подобни на човешките модели на сиалиране. Вмъкването е стабилно в MDCK клетките. Тази класификация се прилага само в Германия и може да се различава в други страни.

Биомолекулярни данни

Protein expression Транспонирани с ST6 бета-галактозид алфа-2,6-сиалилтрансфераза 1 (ST6GAL1, SIAT1)

Работа с

Culture Medium DMEM, w: 4,5 g/L глюкоза, w: 4 mM L-глутамин, w: 3,7 g/L NaHCO₃, w: 1,0 mM натриев пируват (номер на изделието на Cytion 820300a)

Supplements Допълнете средата с 10% FBS и 1mg/ml G418

Dissociation Reagent Accutase

Doubling time 21 до 31 часа

Subculturing Отстранете старата среда от адхезивните клетки и ги промийте с PBS, която не съдържа калций и магнезий. За колби T25 използвайте 3-5 ml PBS, а за колби T75 - 5-10 ml. След това покрийте клетките изцяло с Accutase, като използвате 1-2 ml за колби T25 и 2,5 ml за колби T75. Оставете клетките да се инкубират на стайна температура за 8-10 минути, за да се отделят. След инкубацията внимателно разбъркайте клетките с 10 ml среда, за да ги ресуспендирайте, след което центрофугирайте при 300xg за 3 минути. Изхвърлете супернатантата, ресуспендирайте клетките в прясна среда и ги прехвърлете в нови колби, които вече съдържат прясна среда.

Seeding density 2 до 4×10^4 клетки/cm²

Fluid renewal 2 до 3 пъти седмично

Клетки MDCK-SIAT1 | 602281**Freeze medium**

Като среда за криоконсервация използваме пълна среда за растеж (включително FBS) + 10% DMSO за адекватна жизнеспособност след размразяване или CM-1 (каталожен номер 800100 на Cytion), която включва оптимизирани осмопротектори и метаболитни стабилизатори за подобряване на възстановяването и намаляване на криоиндуцирания стрес.

Thawing and Culturing Cells

1. Уверете се, че флаконът остава дълбоко замразен при доставката, тъй като клетките се транспортират със сух лед, за да се поддържат оптимални температури по време на транспортирането.
2. При получаване или съхранявайте незабавно криовиолата при температури под $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, за да осигурите запазване на клетъчната цялост, или преминете към стъпка 3, ако е необходимо незабавно култивиране.
3. За незабавно култивиране бързо размразете флакона, като го потопите във водна баня с чиста вода и антимикуробен агент с температура $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, като разбърквате внимателно в продължение на 40-60 секунди, докато остане малка ледена бучка.
4. Извършвайте всички следващи стъпки при стерилни условия в аспиратор, като преди отваряне дезинфекцирате криовиолата със 70% етанол.
5. Внимателно отворете дезинфекцирания флакон и прехвърлете клетъчната суспензия в 15 ml центрофужна епруветка, съдържаща 8 ml хранителна среда със стайна температура, като разбърквате внимателно.
6. Центрофугирайте сместа при $300 \times g$ в продължение на 3 минути, за да отделите клетките, и внимателно изхвърлете супернатантата, съдържаща остатъчна замразяваща среда.
7. Внимателно ресуспендирайте клетъчната пелета в 10 ml прясна хранителна среда. За адхезивни клетки разделете суспензията между две колби T25; за суспензионни култури прехвърлете цялата среда в една колба T25, за да стимулирате ефективното взаимодействие и растеж на клетките.
8. Придържайте се към установените протоколи за субкултивиране за непрекъснат растеж и поддържане на клетъчната линия, като гарантирате надеждни експериментални резултати.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , овлажнена атмосфера.

Flask Coating

Няма

Клетки MDCK-SIAT1 | 602281

Freezing Procedure

Криоконсервираните клетъчни линии се транспортират върху сух лед във валидирана, изолирана опаковка с достатъчно хладилен агент, за да се поддържа приблизително -78°C по време на транспортирането. При получаването незабавно прегледайте опаковката и незабавно прехвърлете флаконите за подходящо съхранение.

Shipping Conditions

Криоконсервираните клетъчни линии се транспортират върху сух лед във валидирана, изолирана опаковка с достатъчно хладилен агент, за да се поддържа приблизително -78°C по време на транспортирането. При получаването незабавно прегледайте опаковката и незабавно прехвърлете флаконите за подходящо съхранение.

Storage Conditions

За дълготрайно съхранение поставете флаконите в течен азот в парна фаза при температура около -150 до -196°C . Съхранението при -80°C е приемливо само като кратък междинен етап преди прехвърлянето в течен азот.

Контрол на качеството / Генетичен профил / HLA

Sterility

Замърсяването с микоплазма се изключва както чрез PCR-базирани анализи, така и чрез луминесцентни методи за откриване на микоплазма.

За да се гарантира, че няма бактериално, гъбично или дрождево замърсяване, клетъчните култури се подлагат на ежедневни визуални проверки.