

Články RF/6A | 305150

Obecné informace

Description

RF/6A je buněčná linie endoteliálních buněk sítnice a cévnatky makaka rhesus (*Macaca mulatta*), získaná z fetální cévnatky a sítnice. Tato linie je v databázi Cellosaurus registrována pod označením CVCL_4552 a roste jako adhezivní monovrstva s epitelální morfologií. Buňky RF/6A si zachovávají klíčové endoteliální charakteristiky, včetně exprese faktoru VIII (von Willebrandův faktor), fibronektinu a Weibel-Paladeho granulí detekovatelných elektronovou mikroskopií – přičemž právě tyto granule potvrzují jejich endoteliální identitu. Tato linie byla původně vytvořena pro studium vaskularizace sítnice a cévnatky a je široce využívána jako model endotelu primátů pro výzkum oční angiogeneze.

RF/6A je použitelná ve výzkumu oční angiogeneze, ve studiích vaskularizace sítnice a cévnatky, při hodnocení antiangiogenních látek (inhibitory VEGF, bevacizumab, ranibizumab), modelování věkem podmíněné makulární degenerace (AMD), biologie diabetické retinopatie a hodnocení vaskulární permeability v očním mikroprostředí. Díky svému původu z nehumánních primátů (NHP) je linie RF/6A blíže biologii cévní sítě lidské sítnice než endoteliální modely hlodavců, zejména pro studie zahrnující reakce na izoformy VEGF specifické pro primáty a oční farmakologii. Tato linie se běžně používá v testech tvorby trubiček, testech migrace a experimentech se stimulací VEGF.

RF/6A se kultivuje jako adhezivní kultura v médiu EMEM doplněném 10 % FBS a 1 % NEAA při teplotě 37 °C ve zvlhčené atmosféře s 5 % CO₂. Buňky se subkultivují pomocí Accutase při 70–80 % konfluenci, aby se zabránilo kontaktní inhibici a ztrátě endoteliálního fenotypu. Poměr dělení 1:3 až 1:5, hustota výsevu 1–2 × 10⁴ buněk/cm². Médium se obnovuje 2–3krát týdně.

Organism

Makak rhesus

Tissue

Cévnatka, sítnice

Disease

Normální endotel sítnice a cévnatky (fetální; netumorigenní)

Metastatic site

Neplatí (normální buněčná linie endoteliálních buněk choroidální vrstvy sítnice plodu)

Applications

Výzkum oční angiogeneze; vaskularizace sítnice a cévnatky; hodnocení terapie anti-VEGF (bevacizumab, ranibizumab); modelování AMD a diabetické retinopatie; testy tvorby trubiček; vaskulární permeabilita; model endotelu sítnice primátů z řádu NHP

Charakteristika

Age

Plod

Gender

Pohlaví nespecifikováno

Ethnicity

Nevztahuje se (buněčná linie primáta jiného než člověka; *Macaca mulatta*)

Morphology

Epitelu podobné

Články RF/6A | 305150

Cell type Endoteliální buňky**Growth properties** Adherentní

Regulační údaje

Citation RF/6A (katalogové číslo Cytion 305150)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9544**CellosaurusAccession** CVCL_4552**GMO Status** Bez genetické modifikace; buněčná linie endoteliálních buněk choroidální vrstvy sítnice plodu makaka rhesus divokého typu

Biomolekulární data

Protein expression Faktor , fibronektin

Zpracování

Culture Medium EMEM (MEM Eagle), w: 2 mM L-Glutamin, w: 2,2 g/l NaHCO₃, w: EBSS (číslo článku Cytion 820100a)**Supplements** Doplňte médium o 10 % FBS a 1 % NEAA**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** přibližně 24 až 36 hodin**Subculturing** Odstraňte staré médium z adheovaných buněk a promyjte je PBS bez vápníku a hořčíku. Pro baňky T25 použijte 3-5 ml PBS a pro baňky T75 5-10 ml. Poté buňky zcela zakryjte přípravkem Accutase, přičemž použijte 1-2 ml pro baňky T25 a 2,5 ml pro baňky T75. Nechte buňky inkubovat při pokojové teplotě po dobu 8-10 minut, aby se oddělily. Po inkubaci jemně promíchejte buňky s 10 ml média, aby byly znovu suspendovány, a poté je odstředte při 300xg po dobu 3 minut. Supernatant vyhodte, buňky znovu rozpustte v čerstvém médiu a přeneste je do nových baněk, které již obsahují čerstvé médium.

Člásky RF/6A | 305150

Split ratio 1 až 5**Seeding density** 1 až 2×10^4 buněk/cm²**Fluid renewal** 2 až 3krát týdně**Post-Thaw Recovery** Po rozmrazení naneste buňky na kulturační misky v hustotě 5×10^4 buněk/cm² a před první výměnou média vyčkejte alespoň 24 hodin, aby se buňky přichytily. Nedovolte, aby kultury dosáhly plné konfluence, protože kontaktní inhibice může oslabit endoteliální fenotyp.**Freeze medium** Jako kryokonzervační médium používáme kompletní růstové médium (včetně FBS) + 10 % DMSO pro zajištění dostatečné životaschopnosti po rozmrazení nebo CM-1 (katalogové číslo 800100 společnosti Cytion), které obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory pro zlepšení regenerace a snížení stresu způsobeného kryem.**Thawing and Culturing Cells**

1. Ověřte si, že lahvička zůstane při dodání hluboce zmrazená, protože buňky se přepravují na suchém ledu, aby se během přepravy udržely optimální teploty.
2. Po obdržení kryovialku buď okamžitě uložte při teplotě nižší než -150 °C, abyste zajistili zachování buněčné integrity, nebo přejděte ke kroku 3, pokud je nutná okamžitá kultivace.
3. Pro okamžitou kultivaci rychle rozmrazte lahvičku ponořením do vodní lázně o teplotě 37 °C s čistou vodou a antimikrobiálním prostředkem a jemně ji míchejte po dobu 40-60 sekund, dokud nezůstane malý ledový chuchvalec.
4. Všechny další kroky provádějte za sterilních podmínek v průtokové digestoři a před otevřením kryovialku dezinfikujte 70% ethanolem.
5. Opatrně otevřete dezinfikovanou lahvičku a přeneste buněčnou suspenzi do 15 ml centrifugační zkušavky obsahující 8 ml kulturačního média o pokojové teplotě a jemně promíchejte.
6. Směs odstředujte při 300 x g po dobu 3 minut, aby se buňky oddělily, a supernatant obsahující zbytky mrazicího média opatrně zlikvidujte.
7. Pelety buněk jemně resuspendujte v 10 ml čerstvého kulturačního média. U adherentních buněk rozdělte suspenzi mezi dvě kulturační baňky T25; u suspenzních kultur přeneste veškeré médium do jedné baňky T25, abyste podpořili účinnou interakci a růst buněk.
8. Dodržujte zavedené subkulturační protokoly pro kontinuální růst a udržování buněčné linie, čímž zajistíte spolehlivé výsledky experimentů.

Člásky RF/6A | 305150

Incubation Atmosphere 37 °C, 5 %_{CO2}, zvlhčená atmosféra.

Flask Coating Žádný

Freezing Procedure Kryokonzervované buněčné linie se přepravují na suchém ledu v ověřených, izolovaných obalech s dostatečným množstvím chladiva, aby se po celou dobu přepravy udržovala teplota přibližně -78 °C. Po obdržení ihned zkontrolujte obal a neprodleně přeneste lahvičky do vhodného skladu.

Shipping Conditions Kryokonzervované buněčné linie se přepravují na suchém ledu v ověřených, izolovaných obalech s dostatečným množstvím chladiva, aby se po celou dobu přepravy udržovala teplota přibližně -78 °C. Po obdržení ihned zkontrolujte obal a neprodleně přeneste lahvičky do vhodného skladu.

Storage Conditions Pro dlouhodobé uchování umístěte lahvičky do kapalného dusíku v plynné fázi při teplotě přibližně -150 až -196 °C. Skladování při -80 °C je přijatelné pouze jako krátký přechodný krok před přemístěním do kapalného dusíku.

Kontrola kvality / Genetický profil / HLA

Sterility Kontaminace mykoplazmaty je vyloučena jak pomocí testů založených na PCR, tak pomocí luminiscenčních metod detekce mykoplazmy.

Aby se zajistilo, že nedojde ke kontaminaci bakteriemi, plísněmi nebo kvasinkami, jsou buněčné kultury denně podrobovány vizuálním kontrolám.