

## RF/6A-celler | 305150

## Generel information

## Description

RF/6A er en endotelcellelinje fra nethinden og årehinden hos rhesusmakaken (*Macaca mulatta*), der er etableret ud fra føtalt væv fra årehinden og nethinden. Linjen er registreret i Cellosaurus under betegnelsen CVCL\_4552 og vokser som et vedhæftende monolag med epitellignende morfologi. RF/6A-celler bevarer vigtige endotelcellekaraktistika, herunder ekspresion af faktor VIII (von Willebrand-faktor), fibronektin og Weibel-Palade-granuler, der kan påvises ved elektronmikroskopi – hvor sidstnævnte bekræfter deres endotelcelleidentitet. Linjen blev oprindeligt etableret til studier af vaskularisering i nethinden og årehinden og er blevet bredt anvendt som en primat-endotelmodel til forskning i okulær angiogenese.

RF/6A kan anvendes i forskning i okulær angiogenese, undersøgelser af vaskularisering i nethinden og årehinden, evaluering af antiangiogene midler (VEGF-hæmmere, bevacizumab, ranibizumab), modellering af aldersrelateret makuladegeneration (AMD), biologi ved diabetisk retinopati samt vurdering af vaskulær permeabilitet i det okulære mikromiljø. Da RF/6A stammer fra ikke-menneskelige primater (NHP), ligger den tættere på den menneskelige nethindens vaskulære biologi end endotelmodeller fra gnavere, især i forbindelse med undersøgelser, der involverer primatspecifikke VEGF-isoformresponser og okulær farmakologi. Stammen anvendes almindeligvis i rørdannelsesassays, migrationsassays og VEGF-stimuleringsforsøg.

RF/6A opbevares som en adhærent kultur i EMEM tilsat 10 % FBS og 1 % NEAA ved 37 °C i en befugtet atmosfære med 5 % CO<sub>2</sub>. Cellerne subkultiveres med Accutase ved 70–80 % konfluens for at forhindre kontakthibering og tab af endotelfenotypen. Opdelingsforhold 1:3 til 1:5, udsåningstæthed 1–2 × 10<sup>4</sup> celler/cm<sup>2</sup>. Mediet udskiftes 2–3 gange om ugen.

## Organism

Rhesus makak

## Tissue

Årehinde, nethinde

## Disease

Normalt endotel i nethinden og årehinden (foster; ikke-tumorfremkaldende)

## Metastatic site

Ikke relevant (normal cellelinje fra fosterets nethinde og årehinde)

## Applications

Forskning i okulær angiogenese; vaskularisering af nethinden og årehinden; evaluering af anti-VEGF-behandling (bevacizumab, ranibizumab); modellering af AMD og diabetisk retinopati; rørdannelsesforsøg; vaskulær permeabilitet; nethindeendotelmodel hos NHP-primater

## Karakteristika

## Age

Foster

## Gender

Køn uspecificeret

## Ethnicity

Ikke relevant (cellelinje fra ikke-menneskelige primater; *Macaca mulatta*)

## Morphology

Epitel-lignende

## RF/6A-celler | 305150

**Cell type** Endotheliale celler**Growth properties** Vedhæftende**Regulatoriske data****Citation** RF/6A (Cytion katalognummer 305150)**Biosafety level** 1**NCBI\_TaxID** 9544**CellosaurusAccession** CVCL\_4552**GMO Status** Ingen genetisk modifikation; vildtype-cellelinje fra endotelceller i nethinden og årehinden hos rhesusmakak-foster**Biomolekylære data****Protein expression** Faktor , fibronektin**Håndtering****Culture Medium** EMEM (MEM Eagle), w: 2 mM L-Glutamin, w: 2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, w: EBSS (Cytion artikelnummer 820100a)**Supplements** Suppler mediet med 10% FBS og 1% NEAA**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** ca. 24 til 36 timer**Subculturing** Fjern det gamle medium fra de klæbende celler, og vask dem med PBS, der ikke indeholder calcium og magnesium. Brug 3-5 ml PBS til T25-kolber og 5-10 ml til T75-kolber. Dæk derefter cellerne helt med Accutase, brug 1-2 ml til T25-kolber og 2,5 ml til T75-kolber. Lad cellerne inkubere ved stuetemperatur i 8-10 minutter for at løsne dem. Efter inkubationen blandes cellerne forsigtigt med 10 ml medium for at resuspendere dem, og centrifugeres derefter ved 300xg i 3 minutter. Kassér supernatanten, resuspender cellerne i frisk medium, og overfør dem til nye kolber, der allerede indeholder frisk medium.

## RF/6A-celler | 305150

**Split ratio** 1 til 5**Seeding density** 1 til  $2 \times 10^4$  celler/cm<sup>2</sup>**Fluid renewal** 2 til 3 gange om ugen**Post-Thaw Recovery** Efter optøning udplades cellerne med en tæthed på  $5 \times 10^4$  celler/cm<sup>2</sup>, og der skal gå mindst 24 timer, før det første medieskift foretages, så cellerne kan hæfte sig fast. Lad ikke kulturerne nå fuld konfluens, da kontakthibering kan reducere den endoteliale fænotype.**Freeze medium** Som kryopræservesmedium bruger vi komplet vækstmedium (inklusive FBS) + 10 % DMSO for tilstrækkelig levedygtighed efter optøning eller CM-1 (Cytion-katalognummer 800100), som indeholder optimerede osmobybeskyttende stoffer og metaboliske stabilisatorer for at forbedre genopretningen og reducere kryoinduceret stress.**Thawing and Culturing Cells**

1. Bekræft, at hætteglasset forbliver dybfrosset ved levering, da cellerne sendes på tøris for at opretholde optimale temperaturer under transport.
2. Ved modtagelsen skal du enten straks opbevare kryohætteglasset ved temperaturer under -150 °C for at sikre, at cellernes integritet bevares, eller gå videre til trin 3, hvis øjeblikkelig dyrkning er påkrævet.
3. Ved øjeblikkelig dyrkning optøs hætteglasset hurtigt ved at nedsænke det i et 37 °C varmt vandbad med rent vand og et antimikrobielt middel og røre forsigtigt i 40-60 sekunder, indtil der kun er en lille isklump tilbage.
4. Udfør alle efterfølgende trin under sterile forhold i en flowhætte, og desinficer kryoviallet med 70 % ethanol, før det åbnes.
5. Åbn forsigtigt det desinficerede hætteglas, og overfør cellesuspensionen til et 15 ml centrifugerør, der indeholder 8 ml kulturmedium ved stuetemperatur, og bland forsigtigt.
6. Centrifuger blandingen ved 300 x g i 3 minutter for at adskille cellerne, og kassér omhyggeligt supernatanten, der indeholder resterende frysemedium.
7. Resuspender forsigtigt cellepelleten i 10 ml frisk dyrkningsmedium. For klæbende celler deles suspensionen mellem to T25-kulturkolber; for suspensionskulturer overføres alt mediet til en T25-kolbe for at fremme effektiv celleinteraktion og -vækst.
8. Overhold etablerede subkulturprotokoller for fortsat vækst og vedligeholdelse af cellelinjen, hvilket sikrer pålidelige eksperimentelle resultater.

## RF/6A-celler | 305150

**Incubation Atmosphere** 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ , befugtet atmosfære.

**Flask Coating** Ingen

**Freezing Procedure** Kryopræservede cellelinjer sendes på tøris i valideret, isoleret emballage med tilstrækkeligt kølemiddel til at opretholde ca. -78 °C under hele transporten. Ved modtagelse skal beholderen straks inspiceres, og hætteglassene skal straks overføres til passende opbevaring.

**Shipping Conditions** Kryopræservede cellelinjer sendes på tøris i valideret, isoleret emballage med tilstrækkeligt kølemiddel til at opretholde ca. -78 °C under hele transporten. Ved modtagelse skal beholderen straks inspiceres, og hætteglassene skal straks overføres til passende opbevaring.

**Storage Conditions** For langtidsopbevaring anbringes hætteglas i flydende nitrogen i dampfase ved ca. -150 til -196 °C. Opbevaring ved -80 °C er kun acceptabelt som et kort mellemtrin før overførsel til flydende nitrogen.

## Kvalitetskontrol / Genetisk profil / HLA

**Sterility** Mycoplasma-kontaminering udelukkes ved hjælp af både PCR-baserede assays og luminescensbaserede mycoplasma-detektionsmetoder.

For at sikre, at der ikke er nogen bakterie-, svampe- eller gærforurening, underkastes cellekulturerne daglige visuelle inspektioner.