

MDCK-SIAT1 rakud | 602281

Üldine teave

Description

MDCK-SIAT1 rakuliin on Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) rakkude modifitseeritud versioon, mis on loodud inimese 2,6-sitalüültransferaasi (SIAT1) kõrgema taseme ekspresseerimiseks. See ensüüm vastutab siaalhappe liitumise eest alfa-2,6 sidemetega galaktoosile glükoproteiinidel ja glükolipiididel. Modifikatsioon viidi läbi, et suurendada alfa-2,6-ühendatud siaalhapete ekspressiooni, mis on inimese gripiviiruste esmased retseptorid. See suurendamine on oluline, sest see muudab MDCK-SIAT1 rakud sarnasemaks inimese hingamisteede epiteelile, kus on looduslikult suur kontsentratsioon neid retseptoreid. Selle tulemusena pakuvad need rakud füsioloogiliselt asjakohasemat mudelit inimese gripiviiruste ja nende koostoimete uurimiseks võimalike viirusevastaste ühenditega.

MDCK-SIAT1 rakkude üks olulisi rakendusi on gripiviiruse tundlikkuse hindamine neuraminidaasi inhibiitorite (NAI), näiteks oseltamiviiri suhtes. Tänu alfa-2,6-ühendatud siaalhapete suurenenud sisaldusele on MDCK-SIAT1 rakud võrreldes modifitseerimata MDCK rakkudega tundlikumad NAI-de suhtes. See muudab nad suurepäraseks vahendiks nende inhibiitorite suhtes resistentsuse tuvastamiseks, eriti inimeste gripiviiruste kliiniliste isolaatide madala läbilaskevõimega isolaatides. MDCK-SIAT1 rakuliin võimaldab täpsemaid in vitro uuringuid ravimite tõhususe ja viiruse retseptorite koostoimete kohta, andes väärtuslikke teadmisi viirusevastaste ravimeetodite ja resistentsuse mehhanismide väljatöötamise kohta.

Organism Koerad

Tissue Neerud

Omadused

Breed/Subspecies Cocker-spanjel

Age Täiskasvanud

Gender Naised

Morphology Epiteel

Growth properties Kinnipeetav

Regulatiivsed andmed

Citation MDCK-SIAT1 (Cytioni katalooginumber 602281)

Biosafety level 2

MDCK-SIAT1 rakud | 602281

NCBI_TaxID 9615

CellosaurusAccession CVCL_Z936

GMO Status GMO-S1: See koerte epiteeli neeurakuliin (MDCK-SIAT1) sisaldab inimese 2,6-sialüültransferaasi (SIAT1) kodeerivat pcDNA3.1GS konstruktsiooni, mis võimaldab inimesele sarnaste sialüülimustrite ekspressiooni. Insert on MDCK rakkudes stabiilselt olemas. See klassifikatsioon kehtib ainult Saksamaal ja võib mujal erineda.

Biomolekulaarsed andmed

Protein expression Transfekteeritud ST6 beeta-galaktosiidi alfa-2,6-sialüültransferaasiga 1 (ST6GAL1, SIAT1)

Töötlemine

Culture Medium DMEM, w: 4,5 g/L glükoosi, w: 4 mM L-glutamiini, w: 3,7 g/L NaHCO₃, w: 1,0 mM naatriumpüruvaati (Cytioni artikli number 820300a)

Supplements Täiendada söötme 10% FBS ja 1 mg/ml G418-ga

Dissociation Reagent Accutase

Doubling time 21 kuni 31 tundi

Subculturing Eemaldage kleepunud rakkudel vana söötme ja peske neid PBS-ga, milles puudub kaltsium ja magneesium. T25 kolbide puhul kasutage 3-5 ml PBS-i ja T75 kolbide puhul 5-10 ml. Seejärel katke rakud täielikult Accutase'iga, kasutades 1-2 ml T25 kolbide puhul ja 2,5 ml T75 kolbide puhul. Laske rakkudel inkubeerida 8-10 minutit toatemperatuuril, et need eralduksid. Pärast inkubeerimist segage rakud ettevaatlikult 10 ml söötmega, et neid resuspenseerida, seejärel tsentrifugeerige 3 minutit 300xg juures. Visake supernatant ära, suspenseerige rakud uuesti värskes keskkonnas ja viige need uutesse kolvidesse, mis sisaldavad juba värsket keskkonda.

Seeding density 2 kuni 4×10^4 rakku/cm²

Fluid renewal 2 kuni 3 korda nädalas

Freeze medium Krüosäilitusvedelikusena kasutame täielikku kasvukeskkonda (sh FBS) + 10% DMSO, et tagada piisav elujõulisus pärast sulatamist, või CM-1 (Cytioni katalooginumber 800100), mis sisaldab optimeeritud osmoprotektante ja metaboolseid stabilisaatoreid, et parandada taastumist ja vähendada krüostressi.

MDCK-SIAT1 rakud | 602281**Thawing and
Culturing Cells**

1. Veenduge, et vial jääb tarnimisel sügavkülmutatud, sest rakud transporditakse kuiva jääga, et säilitada optimaalne temperatuur transpordi ajal.
2. Pärast kättesaamist säilitage krüoviaal kas kohe temperatuuril alla $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, et tagada rakkude terviklikkuse säilimine, või jätkake sammuga 3, kui on vaja koheselt kultiveerida.
3. Kohese kultiveerimise korral sulatage viali kiiresti, kastes selle $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ veevanni puhta vee ja antimikroobse ainega, segades seda õrnalt 40-60 sekundit, kuni alles jääb väike jääklomp.
4. Tehke kõik järgmised toimingud steriilsetes tingimustes vooluhoodis, desinfitseerides krüoviaal enne avamist 70% etanooliga.
5. Avage desinfitseeritud viali ettevaatlikult ja viige raku suspensioon ettevaatlikult segades 15 ml tsentrifuugitorusse, mis sisaldab 8 ml toatemperatuuril olevat kasvukeskkonda.
6. Rakkude eraldamiseks tsentrifuugige segu $300 \times g$ juures 3 minutit ja visake ülejäänud külmutusvedelikku sisaldav supernatant ettevaatlikult ära.
7. Resuspendeerige rakupellet ettevaatlikult 10 ml värskes kasvukeskkonnas. Adhereerivate rakkude puhul jagage suspensioon kahe T25 kultuurkolvi vahel; suspensioonikultuuride puhul kandke kogu söötme keskkond ühte T25 kolbi, et soodustada rakkude tõhusat koostoimet ja kasvu.
8. Järgige kehtestatud subkultuuriprotokolle rakuliini jätkuvaks kasvuks ja säilitamiseks, tagades usaldusväärsed katsetulemused.

**Incubation
Atmosphere**

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , niisutatud atmosfäär.

Flask Coating

Puudub

**Freezing
Procedure**

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige vialid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

**Shipping
Conditions**

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige vialid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

MDCK-SIAT1 rakud | 602281

Storage Conditions

Pikaajaliseks säilitamiseks asetage viaalid aurufaasis vedela lämmastikuga umbes -150 kuni -196 °C juures. Säilitamine temperatuuril -80 °C on vastuvõetav ainult lühikese vaheetapina enne vedela lämmastikuga üleviimist.

Kvaliteedikontroll / Geneetiline profiil / HLA

Sterility

Mükoplasmakontaminatsioon on välistatud nii PCR-põhiste analüüside kui ka luminesentsil põhinevate mükoplasma tuvastamise meetodite abil.

Bakteriaalse, seene- või pärmsaaste puudumise tagamiseks kontrollitakse rakukultuure iga päev visuaalselt.