

MDCK-SIAT1-solut | 602281

Yleisiä tietoja

Description

MDCK-SIAT1-solulinja on muunnettu versio Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) -soluista, jotka on muunnettu ilmentämään suurempia määriä ihmisen 2,6-salytyttransferaasia (SIAT1). Tämä entsyymi vastaa sialiinihapon lisäämisestä alfa-2,6-kytkennässä galaktoosiin glykoproteiineissa ja glykolipideissä. Muunnos tehtiin, jotta voitaisiin lisätä alfa-2,6-sidoksissa olevien sialiinihappojen ilmentymistä, jotka ovat ihmisen influenssavirusten ensisijaisia reseptoreita. Tämä lisäys on ratkaisevan tärkeää, koska se tekee MDCK-SIAT1-soluista enemmän ihmisen hengitysteiden epiteelin kaltaisia, jossa on luonnostaan suuri määrä näitä reseptoreita. Näin ollen nämä solut tarjoavat fysiologisesti relevantin mallin ihmisen influenssavirusten ja niiden vuorovaikutuksen tutkimiseen mahdollisten viruslääkkeiden kanssa.

Yksi MDCK-SIAT1-solujen merkittävistä sovelluksista on influenssavirusten herkkyden arviointi neuraminidaasin estäjille (NAI), kuten oseltamiviirille. Koska MDCK-SIAT1-solut sisältävät enemmän alfa-2,6-sidoksissa olevia sialiinihappoja, niiden herkkyys NAI:lle on parempi kuin muokkaamattomien MDCK-solujen. Tämä tekee niistä erinomaisen välineen resistenssin havaitsemiseen näitä inhibiittoreita vastaan, erityisesti ihmisen influenssavirusten kliinisissä isolaateissa, joiden läpivirtausluku on alhainen. MDCK-SIAT1-solulinjan avulla voidaan tehdä tarkempia in vitro -tutkimuksia lääkkeiden tehosta ja virusreseptorien vuorovaikutuksesta, mikä antaa arvokasta tietoa viruslääkehoitojen ja resistenssimekanismien kehittämisestä.

Organism Koira

Tissue Munuaiset

Ominaisuudet

Breed/Subspecies Cockerspanieli

Age Aikuiset

Gender Nainen

Morphology Epiteeli

Growth properties Tarttuva

Säätelytiedot

Citation MDCK-SIAT1 (Cytionin luettelonumero 602281)

Biosafety level 2

MDCK-SIAT1-solut | 602281

NCBI_TaxID 9615

CellosaurusAccession CVCL_Z936

GMO Status GMO-S1: Tämä koiran epiteelin munuaissolulinja (MDCK-SIAT1) sisältää ihmisen 2,6-sialyylitransferaasia (SIAT1) koodaavaa pcDNA3.1GS-konstruktia, joka mahdollistaa ihmisen kaltaisten sialylaatiomallien ilmentymisen. Insertti on vakaasti läsnä MDCK-soluissa. Tämä luokitus koskee vain Saksaa, ja se voi poiketa muualla.

Biomolekyyli tiedot

Protein expression Transfektoitu ST6-beeta-galaktosidin alfa-2,6-salyyttitransferaasi 1:llä (ST6GAL1, SIAT1)

Käsittely

Culture Medium DMEM, w: 4,5 g/l glukoosia, w: 4 mM L-glutamiinia, w: 3,7 g/l NaHCO₃, w: 1,0 mM natriumpyruvaattia (Cytionin artikkelinumero 820300a)

Supplements Lisätään elatusaineeseen 10 % FBS:ää ja 1 mg/ml G418:aa

Dissociation Reagent Accutase

Doubling time 21-31 tuntia

Subculturing Poista vanha väliaine tarttuneista soluista ja pese ne PBS:llä, josta puuttuu kalsiumia ja magnesiumia. Käytä T25-pulloissa 3-5 ml PBS:ää ja T75-pulloissa 5-10 ml. Peitä sitten solut kokonaan Accutase-valmisteella, käyttäen 1-2 ml T25-pulloissa ja 2,5 ml T75-pulloissa. Anna solujen inkuboitua huoneenlämmössä 8-10 minuuttia solujen irtoamiseksi. Inkuboinnin jälkeen solut sekoitetaan varovasti 10 ml:n väliaineella niiden resuspendoimiseksi ja sentrifugoidaan sitten 300xg:n nopeudella 3 minuutin ajan. Hävitä supernatantti, suspendoi solut uudelleen tuoreessa väliaineessa ja siirrä ne uusiin pulloihin, jotka sisältävät jo tuoretta väliainetta.

Seeding density 2-4 x 10⁴ solua/cm²

Fluid renewal 2-3 kertaa viikossa

Freeze medium Kryosäilytysmediaana käytämme täydellistä kasvualustaa (mukaan lukien FBS) + 10 % DMSO:ta riittävän sulatuksen jälkeisen elinkelpoisuuden varmistamiseksi tai CM-1:tä (Cytionin luettelunumero 800100), joka sisältää optimoituja osmoprotektantteja ja metabolisia stabilisaattoreita, jotka parantavat elpymistä ja vähentävät kryosäilytyksen aiheuttamaa stressiä.

MDCK-SIAT1-solut | 602281

**Thawing and
Culturing Cells**

1. Varmista, että injektiopullo pysyy syväjäädetyttynä toimitettaessa, sillä solut kuljetetaan kuivajäädessä, jotta optimaalinen lämpötila säilyy kuljetuksen aikana.
2. Vastaanottaessa kryopullo joko säilytetään välittömästi alle -150 °C:n lämpötilassa solujen eheyden säilyttämiseksi tai edetään vaiheeseen 3, jos tarvitaan välitöntä viljelyä.
3. Välitöntä viljelyä varten sulata injektiopullo nopeasti upottamalla se 37 °C:n vesihauteeseen, jossa on puhdasta vettä ja antimikrobista ainetta, ja sekoittamalla sitä varovasti 40-60 sekunnin ajan, kunnes jäädästä on jäljellä pieni jäämöhkäle.
4. Suorita kaikki seuraavat vaiheet steriileissä olosuhteissa virtaushupussa ja desinfioi kryopullo 70-prosenttisellä etanolilla ennen avaamista.
5. Avaa desinfioitu injektiopullo varovasti ja siirrä solususpensio 15 ml:n sentrifugiputkeen, joka sisältää 8 ml huoneenlämpöistä elatusainetta, varovasti sekoittaen.
6. Sentrifugoi seosta 300 x g:n voimakkuudella 3 minuutin ajan solujen erottamiseksi ja hävitä varovasti supernatantti, joka sisältää jäännöspakastusmediumia.
7. Suspendoidaan solupelletti varovasti uudelleen 10 ml:aan tuoretta elatusainetta. Jos solut ovat tarttuvia, jaa suspensio kahden T25-kolvin kesken; jos kyseessä ovat suspensioviljelmät, siirrä kaikki väliaine yhteen T25-kolviin solujen tehokkaan vuorovaikutuksen ja kasvun edistämiseksi.
8. Noudata vakiintuneita aliviljelyprotokollia solulinjan jatkuvan kasvun ja ylläpidon varmistamiseksi ja luotettavien kokeellisten tulosten varmistamiseksi.

**Incubation
Atmosphere**

37 °C, 5 % CO_2 , kostutettu ilmakehä.

Flask Coating

Ei mitään

**Freezing
Procedure**

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäädessä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

**Shipping
Conditions**

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäädessä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

MDCK-SIAT1-solut | 602281

Storage Conditions

Pitkäaikaissäilytystä varten injektiopullot asetetaan höyryfaasissa olevaan nestemäiseen tyypeen noin -150 - -196 °C:een. Säilytys -80 °C:ssa on hyväksyttävää vain lyhyenä välivaiheena ennen siirtoa nestemäiseen tyypeen.

Laadunvalvonta / Geneettinen profiili / HLA

Sterility

Mykoplasmakontaminaatio suljetaan pois sekä PCR-pohjaisilla määrittelyillä että luminesenssiin perustuvilla mykoplasman osoitusmenetelmillä.

Bakteeri-, sieni- tai hiivakontaminaation välttämiseksi soluviljelmät tarkastetaan päivittäin silmämääräisesti.