

RF/6A-kennot | 305150

Yleisiä tietoja

Description

RF/6A on rhesusmakakista (Macaca mulatta) peräisin oleva verkkokalvon ja suonikalvon endoteelisolulinja, joka on perustettu sikiön suonikalvo- ja verkkokalvokudoksesta. Linja on rekisteröity Cellosaurus-tietokantaan tunnuksella CVCL_4552, ja se kasvaa kiinnittyvänä yksikerroksisena solukerroksena, jonka morfologia muistuttaa epiteeliä. RF/6A-soluilla on säilynyt keskeisiä endoteelisolujen ominaisuuksia, kuten tekijä VIII:n (von Willebrandin tekijä) ja fibronektiinin ilmentyminen sekä elektronimikroskoopilla havaittavat Weibel-Palade-rakeet – joista viimeksi mainitut vahvistavat solujen endoteeliluonteen. Solulinja perustettiin alun perin verkkokalvon ja suonikalvon verisuonittumisen tutkimusta varten, ja sitä on käytetty laajalti kädellisten endoteelimallina silmän angiogeneesitutkimuksessa.

RF/6A-solulinjaa voidaan käyttää silmän angiogeneesitutkimuksessa, verkkokalvon ja suonikalvon verisuonittumisen tutkimuksessa, antiangiogeenisten aineiden (VEGF-estäjät, bevasitsumabi, ranibitsumabi) arvioinnissa, ikään liittyvän makuladegeneraation (AMD) mallintamiseen, diabeettisen retinopatian biologiaan sekä verisuonten läpäisevyyden arviointiin silmän mikroympäristössä. Koska RF/6A on peräisin muista kuin ihmisapinoista (NHP), se vastaa paremmin ihmisen verkkokalvon verisuonibiologiaa kuin jyrsijöiden endoteelimallit, erityisesti tutkimuksissa, joissa tarkastellaan kädellisten spesifisiä VEGF-isoformien vasteita ja silmän farmakologiaa. Kantaa käytetään yleisesti putkenmuodostusmäärityksissä, migraatiomäärityksissä ja VEGF-stimulaatiokokeissa.

RF/6A-solulinjaa ylläpidetään adheesiivisena viljelmänä EMEM-kasvatusliuoksessa, johon on lisätty 10 % FBS:ää ja 1 % NEAA:ta, 37 °C:ssa kostutetussa 5 %:n CO₂-ilmakehässä. Solut siirrostetaan Accutase-entsyymillä avulla 70–80 %:n konfluenssissa kontaktinestokilpailun ja endoteelifenotyypin menetyksen estämiseksi. Jakosuhte on 1:3–1:5, ja kylvötiheys on 1–2 × 10⁴ solua/cm². Kasvatusliuos uusitaan 2–3 kertaa viikossa.

Organism

Rhesusmakakki

Tissue

Suonikalvo, verkkokalvo

Disease

Normaali verkkokalvon suonikalvon endoteeli (sikiön; ei-kasvainta aiheuttava)

Metastatic site

Ei sovelleta (normaali sikiön verkkokalvon ja suonikalvon endoteelisolulinja)

Applications

Silmän angiogeneesin tutkimus; verkkokalvon ja suonikalvon verisuonitus; anti-VEGF-hoidon arviointi (bevasitsumabi, ranibitsumabi); ikärappeuman (AMD) ja diabeettisen retinopatian mallintaminen; putkenmuodostustestit; verisuonten läpäisevyys; NHP-kädellisten verkkokalvon endoteelimalli

Ominaisuudet

Age

Sikiö

Gender

Sukupuoli määrittelemätön

Ethnicity

Ei sovelleta (muiden kuin ihmisten kädellisten solulinja; Macaca mulatta)

RF/6A-kennot | 305150

Morphology Epiteelin kaltainen

Cell type Endoteelisolut

Growth properties Tarttuva

Säätelytiedot

Citation RF/6A (Cytionin luettelonumero 305150)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9544

CellosaurusAccession CVCL_4552

GMO Status Ei geneettisesti muunnettu; villityyppinen rhesusmakakin sikiön verkkokalvon ja suonikalvon endoteelisolulinja

Biomolekyylitiedot

Protein expression Tekijä , fibronektiini

Käsittely

Culture Medium EMEM (MEM Eagle), w: 2 mM L-Glutamiini, w: 2,2 g/L NaHCO₃, w: EBSS (Cytionin artikkelinumero 820100a)

Supplements Täydennetään elatusainetta 10 % FBS:llä ja 1 % NEAA:lla

Dissociation Reagent Accutase

Doubling time noin 24–36 tuntia

RF/6A-kennot | 305150

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 väliaineita.

Split ratio 1-5

Seeding density $1-2 \times 10^4$ solua/cm²

Fluid renewal 2-3 kertaa viikossa

Post-Thaw Recovery Sulatuksen jälkeen solut siirretään viljelyastioihin tiheydellä 5×10^4 solua/cm² ja annetaan niiden kiinnittyä vähintään 24 tuntia ennen ensimmäistä elatusaineen vaihtoa. Viljelmien ei tule antaa saavuttaa täyttä konfluenssia, sillä kontaktinestovaikutus voi heikentää endoteelifenotyyppiä.

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

RF/6A-kennot | 305150

**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.

RF/6A-kennot | 305150

**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.