

MDCK-SIAT1 ląstelės | 602281

Bendra informacija

Description

MDCK-SIAT1 ląstelių linija yra modifikuota Madin-Darby šunų inkstų (MDCK) ląstelių versija, sukurta taip, kad būtų išreikštas didesnis žmogaus 2,6-sialiltransferazės (SIAT1) kiekis. Šis fermentas atsakingas už sialo rūgšties pridėjimą alfa-2,6 jungtimi prie galaktozės glikoproteinuose ir glikolipiduose. Modifikacija buvo atlikta siekiant padidinti alfa-2,6 junginių sialo rūgščių, kurios yra pagrindiniai žmogaus gripo virusų receptoriai, raišką. Šis padidinimas yra labai svarbus, nes MDCK-SIAT1 ląstelės tampa panašesnės į žmogaus kvėpavimo takų epitelį, kuriame natūraliai yra didelė šių receptorių koncentracija. Todėl šios ląstelės yra fiziologiškai tinkamesnis modelis žmogaus gripo virusams ir jų sąveikai su potencialiais antivirusiniais junginiais tirti.

Vienas iš svarbių MDCK-SIAT1 ląstelių pritaikymo būdų yra gripo viruso jautrumo neuraminidazės inhibitoriams (NAI), tokiems kaip oseltamiviras, vertinimas. Dėl padidėjusio alfa-2,6 silicio rūgščių kiekio MDCK-SIAT1 ląstelės pasižymi geresniu jautrumu NAI, palyginti su nemodifikuotomis MDCK ląstelėmis. Dėl to jos yra puiki priemonė atsparumui šiems inhibitoriams nustatyti, ypač žmogaus gripo virusų klinikiniuose izoliatuose su mažu praėjimo skaičiumi. MDCK-SIAT1 ląstelių linija leidžia atlikti tikslesnius vaistų veiksmingumo ir viruso receptorių sąveikos tyrimus in vitro, todėl galima gauti vertingų įžvalgų apie antivirusinės terapijos ir atsparumo mechanizmų kūrimą.

Organism Šunys

Tissue Inkstai

Charakteristikos

Breed/Subspecies Kokerspanielis

Age Suaugusiųjų

Gender Moteris

Morphology Epitelis

Growth properties Prigludęs

Reguliavimo duomenys

Citation MDCK-SIAT1 (Cytion katalogo numeris 602281)

Biosafety level 2

NCBI_TaxID 9615

MDCK-SIAT1 ląstelės | 602281

CellosaurusAccession CVCL_Z936**GMO Status**

GMO-S1: Šioje šunų epitelio inkstų ląstelių linijoje (MDCK-SIAT1) yra pcDNA3.1GS konstruktas, koduojantis žmogaus 2,6-sialiftransferazę (SIAT1), leidžiantis išreikšti į žmogaus panašius sialilinimo modelius. Įdėklas yra stabilus MDCK ląstelėse. Ši klasifikacija taikoma tik Vokietijoje ir gali skirtis kitose šalyse.

Biomolekuliniai duomenys**Protein expression**

Užkrėsti ST6 beta-galaktozido alfa-2,6-sialiltransferazės 1 (ST6GAL1, SIAT1)

Tvarkymas**Culture Medium**DMEM, š: 4,5 g/l gliukozės, š: 4 mM L-glutamino, š: 3,7 g/l NaHCO₃, š: 1,0 mM natrio piruvato (Cytion gaminio numeris 820300a)**Supplements**

Papildykite terpę 10 % FBS ir 1 mg/ml G418

Dissociation Reagent

Accutase

Doubling time

21-31 val

Subculturing

Pašalinkite seną terpę nuo prilipusių ląstelių ir nuplaukite jas PBS, kuriame nėra kalcio ir magnio. T25 kolboms naudokite 3-5 ml PBS, o T75 kolboms - 5-10 ml. Tuomet visiškai užpilkite ląsteles "Accutase", naudodami 1-2 ml T25 kolboms ir 2,5 ml T75 kolboms. Leiskite ląstelėms inkubuotis kambario temperatūroje 8-10 minučių, kad jos atsiskirtų. Po inkubacijos atsargiai sumaišykite ląsteles su 10 ml terpės, kad jos vėl suspenduotų, tada 3 minutes centrifuguokite 300xg greičiu. Išmeskite supernatantą, vėl sutirpinkite ląsteles šviežioje terpėje ir perkeltkite jas į naujas kolbas, kuriose jau yra šviežia terpė.

Seeding density2-4 x 10⁴ ląstelės/cm²**Fluid renewal**

2-3 kartus per savaitę

Freeze medium

Kaip kriokonservavimo terpę naudojame visišką augimo terpę (įskaitant FBS) + 10 % DMSO, kad būtų užtikrintas tinkamas gyvybingumas po atšildymo, arba CM-1 (Cytion katalogo numeris 800100), kurioje yra optimizuotų osmoprotektorių ir medžiagų apykaitos stabilizatorių, kad būtų pagerintas atsigavimas ir sumažintas kriokonservavimo sukeltas stresas.

MDCK-SIAT1 ląstelės | 602281

Thawing and Culturing Cells

1. Patikrinkite, ar pristatant buteliuką jis išlieka gerai užšaldytas, nes ląstelės gabenamos ant sauso ledo, kad gabenimo metu būtų palaikoma optimali temperatūra.
2. Gavę iš karto laikykite kriovialą žemesnėje nei $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, kad užtikrintumėte ląstelių vientisumo išsaugojimą, arba pereikite prie 3 veiksmo, jei reikia nedelsiant kultivuoti.
3. Jei norite nedelsiant pradėti kultivuoti, greitai atšildykite buteliuką panardindami jį į $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūros vandens vonelę su švariu vandeniu ir antimikrobine priemone, švelniai maišydami 40-60 sekundžių, kol liks nedidelis ledo gabalėlis.
4. Visus tolesnius veiksmus atlikite steriliomis sąlygomis srauto gaubte, prieš atidarydami kriovialą dezinfekuokite jį 70 % etanoliu.
5. Atsargiai atidarykite dezinfekuotą buteliuką ir perpilkite ląstelių suspensiją į 15 ml centrifugos mėgintuvėlį, kuriame yra 8 ml kambario temperatūros mitybinės terpės, atsargiai išmaišykite.
6. Mišinį centrifuguokite 300 x g greičiu 3 minutes, kad atsiskirtų ląstelės, ir atsargiai išmeskite supernatantą su šaldymo terpės likučiais.
7. Švelniai resuspenduokite ląstelių granules 10 ml šviežios mitybinės terpės. Jei ląstelės yra prigludusios, suspensiją padalykite į dvi T25 kolbas; jei tai suspensinės kultūros, visą terpę perkelti į vieną T25 kolbą, kad paskatintumėte veiksmingą ląstelių sąveiką ir augimą.
8. Laikykitės nustatytų subkultūrų protokolų, kad ląstelių linija nuolat augtų ir būtų palaikoma, taip užtikrinant patikimus eksperimentų rezultatus.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , drėkintoje atmosferoje.

Flask Coating

Nėra

Freezing Procedure

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelti mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

Shipping Conditions

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelti mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

MDCK-SIAT1 ląstelės | 602281

Storage Conditions

Norėdami ilgai saugoti, įdėkite buteliukus į garų fazės skystą azotą maždaug -150-196 °C temperatūroje. Laikymas -80 °C temperatūroje yra priimtinas tik kaip trumpas tarpinis etapas prieš perkeliant į skystą azotą.

Kokybės kontrolė / Genetinis profilis / HLA

Sterility

Mikoplazmos užterštumas atmetamas taikant PGR pagrįstus tyrimus ir liuminescencinius mikoplazmos aptikimo metodus.

Siekiant užtikrinti, kad nebūtų užteršimo bakterijomis, grybeliais ar mielėmis, ląstelių kultūros kasdien vizualiai tikrinamos.