

RF/6A elementai | 305150

Bendra informacija

Description

RF/6A – tai rezus makakų (*Macaca mulatta*) tinklainės choroidinio endotelio ląstelių linija, išauginta iš vaisiaus choroidės ir tinklainės audinių. Ši linija „Cellosaurus“ duomenų bazėje registruota kaip CVCL_4552 ir auga kaip prisitvirtinęs monosluoksnis, pasižymintis epitelio tipo morfologija. RF/6A ląstelės išlaiko pagrindines endotelio savybes, įskaitant VIII faktoriaus (von Willebrando faktoriaus), fibronektino ir Weibel-Palade granulių, aptinkamų elektroniniu mikroskopu, ekspresiją – pastarosios patvirtina jų endotelio tapatybę. Ši linija iš pradžių buvo sukurta tinklainės ir choroidės vaskuliarizacijos tyrimams ir plačiai naudojama kaip primatų endotelio modelis akių angiogenezės tyrimams.

RF/6A tinka akių angiogenezės tyrimams, tinklainės ir gyslainės kraujagyslių susidarymo tyrimams, antiangiogeninių preparatų (VEGF inhibitorių, bevacizumabo, ranibizumabo) vertinimui, su amžiumi susijusios geltonosios dėmės degeneracijos (AMD) modeliavimui, diabetinės retinopatijos biologijai ir kraujagyslių pralaidumo akies mikroaplinkoje vertinimui. Kadangi RF/6A kilusi iš nežmogiškų primatų (NHP), ji yra artimesnė žmogaus tinklainės kraujagyslių biologijai nei graužikų endotelio modeliai, ypač atliekant tyrimus, susijusius su primatams būdingomis VEGF izoformų reakcijomis ir akių farmakologija. Ši linija dažnai naudojama vamzdelių formavimo tyrimams, migracijos tyrimams ir VEGF stimuliacijos eksperimentams.

RF/6A linija auginama kaip adhezyvinė kultūra EMEM terpėje, papildytoje 10 % FBS ir 1 % NEAA, 37 °C temperatūroje drėgnoje 5 % CO₂ atmosferoje. Ląstelės perauginamos naudojant „Accutase“ esant 70–80 % konfluencijai, siekiant išvengti kontaktinio slopinimo ir endotelio fenotipo praradimo. Padalijimo santykis 1:3–1:5, pasėjimo tankis 1–2 × 10⁴ ląstelių/cm². Terpė keičiama 2–3 kartus per savaitę.

Organism

Rezus makaka

Tissue

Chorėja, tinklainė

Disease

Normalus tinklainės choroidinis endotelis (embrioninis; netumorogeninis)

Metastatic site

Netaikoma (įprasta vaisiaus tinklainės choroidinės endotelio ląstelių linija)

Applications

Akių angiogenezės tyrimai; tinklainės ir gyslainės kraujagyslių susidarymas; anti-VEGF terapijos vertinimas (bevacizumabas, ranibizumabas); AMD ir diabetinės retinopatijos modeliavimas; vamzdelių formavimosi tyrimai; kraujagyslių pralaidumas; NHP primatų tinklainės endotelio modelis

Charakteristikos

Age

Vaisius

Gender

Lytis nenurodyta

Ethnicity

Netaikoma (nežmogiškųjų primatų ląstelių linija; *Macaca mulatta*)

Morphology

| epitelį panašus

RF/6A elementai | 305150

Cell type Endotelio ląstelės

Growth properties Prigludęs

Reguliavimo duomenys

Citation RF/6A (Cytion katalogo numeris 305150)

Biosafety level 1

NCBI_TaxID 9544

CellosaurusAccession CVCL_4552

GMO Status Be genetinių modifikacijų; natūralios rūšies rezus makakų vaisiaus tinklainės choroidinės endotelio ląstelių linija

Biomolekuliniai duomenys

Protein expression Faktorius , fibronektinas

Tvarkymas

Culture Medium EMEM (MEM Eagle), w: 2 mM L-Glutaminas, w: 2,2 g/L NaHCO₃, w: EBSS (Cytion gaminio numeris 820100a)

Supplements Papildykite terpę 10 % FBS ir 1 % NEAA

Dissociation Reagent Accutase

Doubling time maždaug nuo 24 iki 36 valandų

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 perkelkite jas į naujas kolbas, kuriose jau yra šviežia terpė.

RF/6A elementai | 305150

Split ratio 1-5**Seeding density** $1-2 \times 10^4$ ląstelių/cm²**Fluid renewal** 2-3 kartus per savaitę**Post-Thaw Recovery** Atšildžius, ląsteles pasėkite 5×10^4 ląstelių/cm² tankumu ir prieš pirmąjį terpės keitimą palaukite mažiausiai 24 valandas, kol ląstelės prisitvirtins. Neleiskite, kad kultūros pasiektų visišką konfluenciją, nes kontaktinis slopinimas gali susilpninti endotelio fenotipą.**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.**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 °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 °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 perkelkite 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.

RF/6A elementai | 305150

Incubation Atmosphere 37 °C, 5 %_{CO2}, 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 °C temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkeltite 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 °C temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkeltite mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

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 skystąjį 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.