

RF/6A elementi | 305150

Vispārīga informācija

Description

RF/6A ir rēzusmakaku (*Macaca mulatta*) tīklenes un coroīdas endotēlija šūnu līnija, kas izveidota no augļa coroīdas un tīklenes audiem. Šī līnija ir reģistrēta datu bāzē „Cellosaurus” ar numuru CVCL_4552 un aug kā piekļāvusies monoslāņa kultūra ar epitēlijam līdzīgu morfoloģiju. RF/6A šūnas saglabā galvenās endotēlija īpašības, tostarp VIII faktora (von Willebrand faktora), fibronektīna un Weibel-Palade granulu ekspresiju, kas ir nosakāma ar elektronmikroskopiju – pēdējā no tām apstiprina šo šūnu endotēlija identitāti. Šī līnija sākotnēji tika izveidota tīklenes un coroīdas vaskularizācijas pētījumiem un ir plaši pieņemta kā primātu endotēlija modelis acs angiogēnēzes pētījumiem.

RF/6A ir piemērota pētījumiem par acs angiogēnēzi, tīklenes un horioīdas vaskularizāciju, antiangiogēno līdzekļu (VEGF inhibitori, bevacizumabs, ranibizumabs) novērtēšanu, ar vecumu saistītās makulas deģenerācijas (AMD) modelēšanai, diabētiskās retinopātijas bioloģijas izpētei un asinsvadu caurlaidības novērtēšanai acs mikrovidē. Tā kā RF/6A ir cēlusies no primātiem (NHP), tā ir tuvāka cilvēka tīklenes asinsvadu bioloģijai nekā grauzēju endotēlija modeļi, it īpaši pētījumos, kuros tiek izpētītas primātiem raksturīgās VEGF izoformu reakcijas un acs farmakoloģija. Šo šūnu līniju parasti izmanto cauruļveida struktūru veidošanās testos, migrācijas testos un VEGF stimulācijas eksperimentos.

RF/6A tiek uzturēta kā adhezīva kultūra EMEM barotnē, kam pievienots 10 % FBS un 1 % NEAA, 37 °C temperatūrā mitrinātā 5 % CO₂ atmosfērā. Šūnas tiek subkultivētas ar Accutase, sasniedzot 70–80 % konfluenci, lai novērstu kontakta inhibīciju un endotēlija fenotipa zudumu. Dalīšanas attiecība ir 1:3 līdz 1:5, sēšanas blīvums – 1–2 × 10⁴ šūnas/cm². Barotni nomaina 2–3 reizes nedēļā.

Organism

Rezus makaka

Tissue

Dzīslenē, tīklene

Disease

Normāls tīklenes horoidālais endotēlijs (augļa; netumorogēns)

Metastatic site

Neattiecas (normāla augļa tīklenes un asinsvadu apvalka endotēlija šūnu līnija)

Applications

Pētījumi par acu angiogēnēzi; tīklenes un horioīdas vaskularizācija; anti-VEGF terapijas novērtēšana (bevacizumabs, ranibizumabs); AMD un diabētiskās retinopātijas modelēšana; caurulīšu veidošanās testi; asinsvadu caurlaidība; NHP primātu tīklenes endotēlija modelis

Raksturojums

Age

Auglis

Gender

Dzimums nav precizēts

Ethnicity

Neattiecas (cilvēkam nepiederīga primātu šūnu līnija; *Macaca mulatta*)

Morphology

Epitēlijveidīgs

RF/6A elementi | 305150

Cell type Endotēlija šūnas**Growth properties** Adherent**Normatīvie dati****Citation** RF/6A (Cytion kataloga numurs 305150)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9544**CellosaurusAccession** CVCL_4552**GMO Status** Bez ģenētiskām modifikācijām; savvaļas tipa rēzuskakau augļa tīklenes horoidālās endotēlija šūnu līnija**Biomolekulārie dati****Protein expression** Faktors , fibronektīns**Darbs ar****Culture Medium** EMEM (MEM Eagle), w: 2 mM L-glutamīns, w: 2,2 g/L NaHCO₃, w: EBSS (Cytion izstrādājuma numurs 820100a)**Supplements** Papildināt barotni ar 10% FBS un 1% NEAA**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** aptuveni 24 līdz 36 stundas**Subculturing** Noņemt veco barotni no pielipušajām šūnām un mazgāt tās ar PBS, kurā nav kalcija un magnija. T25 kolbām izmantojiet 3-5 ml PBS, bet T75 kolbām - 5-10 ml. Pēc tam pilnībā pārklājiet šūnas ar Accutase, izmantojot 1-2 ml T25 kolbām un 2,5 ml T75 kolbām. Ļaujiet šūnām inkubēties istabas temperatūrā 8-10 minūtes, lai tās atdalītos. Pēc inkubācijas uzmanīgi samaisiet šūnas ar 10 ml barotnes, lai tās atkārtoti suspendētu, pēc tam centrifugējiet 3 minūtes ar 300xg. Izmetiet supernatantu, atkārtoti suspendējiet šūnas svaigā barotnē un pārvietojiet tās jaunās kolbās, kurās jau ir svaiga barotne.

RF/6A elementi | 305150

Split ratio no 1 līdz 5

Seeding density 1 līdz 2×10^4 šūnas/cm²

Fluid renewal 2 līdz 3 reizes nedēļā

Post-Thaw Recovery Pēc atkausēšanas izsējiet šūnas ar blīvumu 5×10^4 šūnas/cm² un pirms pirmās barotnes nomaiņas ļaujiet tām vismaz 24 stundas pielipt pie virsmas. Neļaujiet kultūrām sasniegt pilnīgu konfluenci, jo kontakta inhibīcija var samazināt endotēlija fenotipu.

Freeze medium Kā kriokonservēšanas barotni mēs izmantojam pilnvērtīgu augšanas barotni (ieskaitot FBS) + 10 % DMSO, lai nodrošinātu pietiekamu dzīvotspēju pēc atkausēšanas, vai CM-1 (Cytion kataloga numurs 800100), kas ietver optimizētus osmoprotektorus un metaboliskos stabilizatorus, lai uzlabotu atveseļošanos un samazinātu krioinducēto stresu.

Thawing and Culturing Cells

1. Pārliecinieties, ka pēc piegādes flakons paliek dziļi sasaldēts, jo šūnas tiek sūtītas uz sausā ledus, lai pārvadāšanas laikā saglabātu optimālu temperatūru.
2. Pēc saņemšanas vai nu nekavējoties uzglabāt kriovialu temperatūrā, kas zemāka par -150 °C, lai nodrošinātu šūnu integritātes saglabāšanu, vai arī turpināt 3. posmu, ja nepieciešama tūlītēja kultivēšana.
3. Tūlītējas kultivēšanas gadījumā ātri atkausējiet flakonu, iegremdējot to 37°C ūdens vannā ar tīru ūdeni un antibakteriālu līdzekli, viegli maisot 40-60 sekundes, līdz paliek neliels ledus gabaliņš.
4. Visas turpmākās darbības veiciet sterilos apstākļos plūsmas nosūcējā, pirms atvēršanas dezinficējot kriovialu ar 70% etanolu.
5. Uzmanīgi atveriet dezinficēto flakonu un pārnesiet šūnu suspensiju 15 ml centrifūgas mēģenē, kurā ir 8 ml istabas temperatūras barotnes, uzmanīgi samaisot.
6. Centrifugējiet maisījumu ar 300 x g 3 minūtes, lai atdalītu šūnas, un uzmanīgi izmetiet virskārtu, kas satur saldēšanas barotnes atlikumus.
7. Viegli resuspendēt šūnu granulas 10 ml svaigas barotnes. Adhēzijas šūnu gadījumā suspensiju sadalīt divās T25 kolbās; suspensijas kultūrām visu barotni pārnest vienā T25 kolbā, lai veicinātu efektīvu šūnu mijiedarbību un augšanu.
8. Ievērojiet noteiktos subkultūru protokolus, lai nodrošinātu nepārtrauktu šūnu līnijas augšanu un uzturēšanu, tādējādi nodrošinot uzticamus eksperimentu rezultātus.

RF/6A elementi | 305150

Incubation Atmosphere 37°C, 5% CO_2 , mitrināta atmosfēra.

Flask Coating Nevieni

Freezing Procedure Kriokonservētas šūnu līnijas tiek sūtītas uz sausā ledus apstiprinātā, izolētā iepakojumā ar pietiekamu dzesēšanas šķidrums daudzumu, lai visā transportēšanas laikā uzturētu aptuveni -78 °C temperatūru. Pēc saņemšanas nekavējoties pārbaudiet iepakojumu un nekavējoties pārvietojiet flakonus uz atbilstošu uzglabāšanas vietu.

Shipping Conditions Kriokonservētas šūnu līnijas tiek sūtītas uz sausā ledus apstiprinātā, izolētā iepakojumā ar pietiekamu dzesēšanas šķidrums daudzumu, lai visā transportēšanas laikā uzturētu aptuveni -78 °C temperatūru. Pēc saņemšanas nekavējoties pārbaudiet iepakojumu un nekavējoties pārvietojiet flakonus uz atbilstošu uzglabāšanas vietu.

Storage Conditions Ilgstošai uzglabāšanai flakonus ievietojiet šķidrā slāpekļī ar tvaika fāzi aptuveni -150 līdz -196 °C temperatūrā. Uzglabāšana -80 °C temperatūrā ir pieļaujama tikai kā īss starposms pirms pārvietošanas uz šķidro slāpekli.

Kvalitātes kontrole / Ģenētiskais profils / HLA

Sterility Mikoplazmas piesārņojums tiek izslēgts, izmantojot gan uz PCR balstītus testus, gan uz luminiscenci balstītas mikoplazmas noteikšanas metodes.

Lai pārliecinātos, ka nav baktēriju, sēnīšu vai rauga piesārņojuma, šūnu kultūras katru dienu vizuāli pārbauda.