

MDCK-SIAT1-cellen | 602281

Algemene informatie

Description

De MDCK-SIAT1 cellijn is een gemodificeerde versie van de Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cellen, ontworpen om hogere niveaus van humaan 2,6-sialyltransferase (SIAT1) tot expressie te brengen. Dit enzym is verantwoordelijk voor de toevoeging van siaalzuur in een alfa-2,6 koppeling aan galactose op glycoproteïnen en glycolipiden. De modificatie werd uitgevoerd om de expressie te verhogen van alfa-2,6-gekoppelde siaalzuren, die de primaire receptoren zijn voor humane influenzavirussen. Deze verbetering is cruciaal omdat het de MDCK-SIAT1 cellen meer doet lijken op het menselijke luchtwegepitheel, dat van nature een hoge concentratie van deze receptoren heeft. Hierdoor bieden deze cellen een fysiologisch relevanter model voor het bestuderen van humane influenzavirussen en hun interacties met potentiële antivirale verbindingen.

Een van de belangrijkste toepassingen van MDCK-SIAT1 cellen is de beoordeling van de gevoeligheid van influenzavirussen voor neuraminidaseremmers (NAI's), zoals oseltamivir. Door de verhoogde aanwezigheid van alfa-2,6-gekoppelde siaalzuren zijn MDCK-SIAT1 cellen gevoeliger voor NAI's dan ongemodificeerde MDCK cellen. Hierdoor zijn ze een uitstekend hulpmiddel voor het opsporen van resistentie tegen deze remmers, vooral in klinische isolaten van humane influenzavirussen met een laag aantal passages. De MDCK-SIAT1 cellijn maakt nauwkeuriger in vitro studies van de werkzaamheid van geneesmiddelen en virale receptorinteracties mogelijk, wat waardevolle inzichten oplevert in de ontwikkeling van antivirale therapieën en resistentiemechanismen.

Organism Hoektand

Tissue Nieren

Kenmerken

Breed/Subspecies Cocker Spaniël

Age Volwassen

Gender Vrouw

Morphology Epitheel

Growth properties Aanhangend

Regelgevende gegevens

Citation MDCK-SIAT1 (Cytion catalogusnummer 602281)

Biosafety level 2

MDCK-SIAT1-cellen | 602281

NCBI_TaxID 9615

CellosaurusAccession CVCL_Z936

GMO Status GMO-S1: Deze canine epitheliale niercellijn (MDCK-SIAT1) bevat een pcDNA3.1GS construct dat codeert voor humaan 2,6-sialyltransferase (SIAT1), waardoor expressie van mensachtige sialylatiepatronen mogelijk is. Het insert is stabiel aanwezig in MDCK-cellen. Deze classificatie geldt alleen binnen Duitsland en kan elders afwijken.

Biomoleculaire gegevens

Protein expression Getransfecteerd met ST6 bèta-galactoside alfa-2,6-sialyltransferase 1 (ST6GAL1, SIAT1)

Omgaan met

Culture Medium DMEM, w: 4,5 g/L Glucose, w: 4 mM L-Glutamine, w: 3,7 g/L NaHCO₃, w: 1,0 mM Natriumpyruvaat (Cytion artikelnummer 820300a)

Supplements Vul het medium aan met 10% FBS en 1mg/ml G418

Dissociation Reagent Accutase

Doubling time 21 tot 31 uur

Subculturing Verwijder het oude medium van de adherente cellen en was ze met PBS zonder calcium en magnesium. Gebruik voor T25-flesjes 3-5 ml PBS en voor T75-flesjes 5-10 ml. Bedek de cellen vervolgens volledig met Accutase, met 1-2 ml voor T25-flesjes en 2,5 ml voor T75-flesjes. Laat de cellen gedurende 8-10 minuten bij kamertemperatuur incuberen om ze los te maken. Na incubatie de cellen voorzichtig mengen met 10 ml medium om ze te resuspenden en vervolgens centrifugerend bij 300xg gedurende 3 minuten. Gooi het supernatant weg, resuspendeer de cellen in vers medium en breng ze over in nieuwe kolven die al vers medium bevatten.

Split ratio Een verhouding van 1:10 tot 1:20 wordt aanbevolen.

Seeding density 2 tot 4 x 10⁴ cellen/cm²

Fluid renewal 2 tot 3 keer per week

MDCK-SIAT1-cellen | 602281

Freeze medium

Als cryoconserveringsmedium gebruiken we volledig groeimeidium (inclusief FBS) + 10% DMSO voor voldoende levensvatbaarheid na het ontdooien, of CM-1 (Cytion catalogusnummer 800100), dat geoptimaliseerde osmoprotectanten en metabolische stabilisatoren bevat om het herstel te verbeteren en door cryo geïnduceerde stress te verminderen.

Thawing and Culturing Cells

1. Controleer of de flacon bij levering diepgevroren blijft, aangezien de cellen op droog ijs worden verzonden om optimale temperaturen tijdens het transport te behouden.
2. Bewaar het cryoflesje na ontvangst onmiddellijk bij temperaturen lager dan $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ om de integriteit van de cellen te behouden, of ga verder met stap 3 als onmiddellijke kweek vereist is.
3. Voor onmiddellijke kweek: ontdooi de flacon snel door deze onder te dompelen in een waterbad van $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ met schoon water en een antimicrobieel middel, waarbij u 40-60 seconden zachtjes schudt totdat er een klein ijsklontje overblijft.
4. Voer alle volgende stappen uit onder steriele omstandigheden in een stromingskap en desinfecteer de cryoflacon met 70% ethanol voordat deze wordt geopend.
5. Open voorzichtig de gedesinfecteerde flacon en breng de celsuspensie over in een centrifugebuis van 15 ml met 8 ml kweekmedium op kamertemperatuur en meng voorzichtig.
6. Centrifugeer het mengsel gedurende 3 minuten bij $300 \times g$ om de cellen te scheiden en gooi het supernatant met resterend vriesmedium voorzichtig weg.
7. Resuspendeer de celpellet voorzichtig in 10 ml vers kweekmedium. Verdeel voor adherente cellen de suspensie over twee T25-kweekkolven; breng voor suspensiekweken al het medium over in één T25-kweekkolf om effectieve celinteractie en -groei te bevorderen.
8. Houd u aan de vastgestelde subcultuurprotocollen voor continue groei en onderhoud van de cellijn, om betrouwbare experimentele resultaten te garanderen.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , bevochtigde atmosfeer.

Flask Coating

Geen

Freezing Procedure

Gecryopreserveerde cellijnen worden verzonden op droog ijs in gevalideerde, geïsoleerde verpakkingen met voldoende koelmiddel om gedurende het transport ongeveer $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ te handhaven. Inspecteer de verpakking onmiddellijk na ontvangst en breng de flacons onverwijld over naar de juiste opslagplaats.

MDCK-SIAT1-cellen | 602281

Shipping Conditions

Gecryopreserveerde cellijnen worden verzonden op droog ijs in gevalideerde, geïsoleerde verpakkingen met voldoende koelmiddel om gedurende het transport ongeveer -78 °C te handhaven. Inspecteer de verpakking onmiddellijk na ontvangst en breng de flacons onverwijld over naar de juiste opslagplaats.

Storage Conditions

Voor langdurige bewaring plaatst u flesjes in vloeibare stikstof in dampfase bij ongeveer -150 tot -196 °C. Opslag bij -80 °C is alleen aanvaardbaar als korte tussenstap vóór overbrenging naar vloeibare stikstof.

Kwaliteitscontrole / Genetisch profiel / HLA

Sterility

Mycoplasma-verontreiniging wordt uitgesloten met zowel PCR-gebaseerde testen als op luminescentie gebaseerde mycoplasma-detectiemethoden.

Om er zeker van te zijn dat er geen besmetting is met bacteriën, schimmels of gisten, worden de celculturen dagelijks onderworpen aan visuele inspecties.