

Komórki MDCK-SIAT1 | 602281**Informacje ogólne****Description**

Linia komórkowa MDCK-SIAT1 jest zmodyfikowaną wersją komórek Madin-Darby Canine Kidney (MDCK), zaprojektowaną w celu ekspresji wyższych poziomów ludzkiej 2,6-sialylotransferazy (SIAT1). Enzym ten jest odpowiedzialny za dodawanie kwasu sialowego w wiązaniu alfa-2,6 do galaktozy na glikoproteinach i glikolipidach. Modyfikacja została przeprowadzona w celu zwiększenia ekspresji kwasów sialowych potoczonych wiązaniem alfa-2,6, które są głównymi receptorami dla ludzkich wirusów grypy. To wzmocnienie ma kluczowe znaczenie, ponieważ sprawia, że komórki MDCK-SIAT1 są bardziej podobne do ludzkiego nabłonka dróg oddechowych, który naturalnie ma wysokie stężenie tych receptorów. W rezultacie komórki te oferują bardziej fizjologiczny model do badania ludzkich wirusów grypy i ich interakcji z potencjalnymi związkami przeciwwirusowymi.

Jednym ze znaczących zastosowań komórek MDCK-SIAT1 jest ocena wrażliwości wirusa grypy na inhibitory neuraminidazy (NAI), takie jak oseltamiwir. Ze względu na zwiększoną obecność kwasów alfa-2,6-sialowych, komórki MDCK-SIAT1 wykazują zwiększoną wrażliwość na NAI w porównaniu do niezmodyfikowanych komórek MDCK. To sprawia, że są one doskonałym narzędziem do wykrywania oporności na te inhibitory, zwłaszcza w izolatach klinicznych ludzkich wirusów grypy o niskiej liczbie przejść. Linia komórkowa MDCK-SIAT1 pozwala na dokładniejsze badania in vitro skuteczności leków i interakcji receptorów wirusowych, zapewniając cenny wgląd w rozwój terapii przeciwwirusowych i mechanizmów oporności.

Organism Pies**Tissue** Nerka**Charakterystyka****Breed/Subspecies** Cocker Spaniel**Age** Dorosły**Gender** Kobieta**Morphology** Nabłonek**Growth properties** Adherent**Dane regulacyjne****Citation** MDCK-SIAT1 (numer katalogowy Cytion 602281)**Biosafety level** 2

Komórki MDCK-SIAT1 | 602281

NCBI_TaxID 9615

CellosaurusAccession CVCL_Z936

GMO Status GMO-S1: Ta linia komórek nabłonkowych nerek psów (MDCK-SIAT1) zawiera konstrukt pcDNA3.1GS kodujący ludzką 2,6-sialilotransferazę (SIAT1), umożliwiając ekspresję ludzkich wzorów sialilacji. Wstawka jest stabilnie obecna w komórkach MDCK. Ta klasyfikacja ma zastosowanie tylko w Niemczech i może się różnić w innych krajach.

Dane biomolekularne

Protein expression Transfekowany beta-galaktozydem ST6 alfa-2,6-sialilotransferazy 1 (ST6GAL1, SIAT1)

Obsługa

Culture Medium DMEM, w: 4,5 g/l glukozy, w: 4 mM L-glutaminy, w: 3,7 g/l NaHCO₃, w: 1,0 mM pirogronianu sodu (numer artykułu Cytion 820300a)

Supplements Uzpełnić podłoże 10% FBS i 1mg/ml G418

Dissociation Reagent Accutase

Doubling time 21 do 31 godzin

Subculturing Usuń starą pożywkę z przylegających komórek i przemyj je PBS, który nie zawiera wapnia i magnezu. W przypadku kolb T25 należy użyć 3-5 ml PBS, a w przypadku kolb T75 5-10 ml. Następnie całkowicie pokryj komórki Accutase, używając 1-2 ml dla kolb T25 i 2,5 ml dla kolb T75. Pozwól komórkom inkubować w temperaturze pokojowej przez 8-10 minut, aby je oddzielić. Po inkubacji delikatnie wymieszaj komórki z 10 ml pożywki, aby ponownie je zawiesić, a następnie odwiruj przy 300xg przez 3 minuty. Odrzucić supernatant, ponownie zawiesić komórki w świeżej pożywce i przenieść je do nowych kolb zawierających już świeżą pożywkę.

Split ratio Zalecany jest stosunek 1:10 do 1:20.

Seeding density 2 do 4 x 10⁴ komórek/cm²

Fluid renewal 2 do 3 razy w tygodniu

Komórki MDCK-SIAT1 | 602281

Freeze medium

Jako pożywki do kriokonserwacji używamy kompletnej pożywki wzrostowej (w tym FBS) + 10% DMSO w celu zapewnienia odpowiedniej żywotności po rozmrożeniu lub CM-1 (numer katalogowy Cytion 800100), która zawiera zoptymalizowane osmoprotektanty i stabilizatory metaboliczne w celu zwiększenia regeneracji i zmniejszenia stresu wywołanego kriokonserwacją.

Thawing and Culturing Cells

1. Upewnij się, że fiolka pozostaje głęboko zamrożona w momencie dostawy, ponieważ komórki są wysyłane w suchym lodzie, aby utrzymać optymalną temperaturę podczas transportu.
2. Po otrzymaniu należy natychmiast przechowywać fiolkę w temperaturze poniżej -150°C , aby zapewnić zachowanie integralności komórek, lub przejść do kroku 3, jeśli wymagana jest natychmiastowa hodowla.
3. W przypadku natychmiastowej hodowli należy szybko rozmrozić fiolkę, zanurzając ją w łaźni wodnej o temperaturze 37°C z czystą wodą i środkiem przeciwdrobnoustrojowym, delikatnie mieszając przez 40-60 sekund, aż pozostanie niewielka grudka lodu.
4. Wykonaj wszystkie kolejne kroki w sterylnych warunkach w kapturze przepływowej, dezynfekując fiolkę 70% etanolem przed otwarciem.
5. Ostrożnie otworzyć zdezynfekowaną fiolkę i przenieść zawiesinę komórek do 15 ml próbówki wirówkowej zawierającej 8 ml podłoża hodowlanego o temperaturze pokojowej, delikatnie mieszając.
6. Wirować mieszaninę z prędkością $300 \times g$ przez 3 minuty w celu oddzielenia komórek i ostrożnie odrzucić supernatant zawierający pozostałości pożywki do zamrażania.
7. Delikatnie ponownie zawiesić osad komórek w 10 ml świeżego podłoża hodowlanego. W przypadku komórek przylegających, rozdzielić zawiesinę pomiędzy dwie kolby hodowlane T25; w przypadku hodowli zawiesinowych, przenieść całą pożywkę do jednej kolby T25 w celu promowania skutecznej interakcji i wzrostu komórek.
8. Przestrzegaj ustalonych protokołów podhodowli w celu ciągłego wzrostu i utrzymania linii komórkowej, zapewniając wiarygodne wyniki eksperymentów.

Incubation Atmosphere

37°C , 5% CO_2 , nawilżona atmosfera.

Flask Coating

Brak

Komórki MDCK-SIAT1 | 602281

Freezing Procedure

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiolki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Shipping Conditions

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiolki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Storage Conditions

W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiolki w ciekłym azocie w fazie lotnej w temperaturze od -150 do -196°C . Przechowywanie w temperaturze -80°C jest dopuszczalne tylko jako krótki etap przejściowy przed przeniesieniem do ciekłego azotu.

Kontrola jakości / Profil genetyczny / HLA

Sterility

Zanieczyszczenie mykoplazmą jest wykluczone przy użyciu zarówno testów opartych na PCR, jak i metod wykrywania mykoplazmy opartych na luminescencji.

Aby upewnić się, że nie ma zanieczyszczenia bakteriami, grzybami lub drożdżami, hodowle komórkowe są poddawane codziennym kontrolom wizualnym.