

## Ogniwa RF/6A | 305150

## Informacje ogólne

## Description

RF/6A to linia komórek śródbłonka naczyń i siatkówki makaka rezusa (*Macaca mulatta*), wyhodowana z tkanki naczyń i siatkówki płodu. Linia ta jest zarejestrowana w bazie Cellosaurus pod numerem CVCL\_4552 i rośnie w postaci przylegającej monowarstwy o morfologii przypominającej nabłonek. Komórki RF/6A zachowują kluczowe cechy śródbłonka, w tym ekspresję czynnika VIII (czynnika von Willebranda), fibronektyny oraz ziarnistości Weibela-Palade'a wykrywalnych za pomocą mikroskopii elektronowej — te ostatnie potwierdzają ich śródbłonkową tożsamość. Linia ta została pierwotnie wyhodowana do badań nad unaczynieniem siatkówki i naczyń i jest szeroko stosowana jako model śródbłonka naczelnych w badaniach nad angiogenezą oczną.

RF/6A ma zastosowanie w badaniach nad angiogenezą oczną, badaniach unaczynienia siatkówki i naczyń, ocenie środków antyangiogennych (inhibitorów VEGF, bewacyzumabu, ranibizumabu), modelowania zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD), biologii retinopatii cukrzycowej oraz oceny przepuszczalności naczyniowej w mikrośrodkowisku oka. Pochodzenie z grupy naczelnych innych niż człowiek (NHP) sprawia, że linia RF/6A jest bliższa biologii naczyń siatkówki człowieka niż modele śródbłonka gryzoni, szczególnie w badaniach dotyczących specyficznych dla naczelnych odpowiedzi izoform VEGF oraz farmakologii oka. Linia ta jest powszechnie wykorzystywana w testach tworzenia naczyń, testach migracji oraz eksperymentach ze stymulacją VEGF.

Linia RF/6A jest hodowana jako hodowla przylegająca w pożywce EMEM uzupełnionej 10% FBS i 1% NEAA w temperaturze 37°C w nawilżonej atmosferze zawierającej 5% CO<sub>2</sub>. Komórki poddaje się subkulturowi przy użyciu Accutase przy 70–80% konfluencji, aby zapobiec hamowaniu kontaktowemu i utracie fenotypu śródbłonka. Stosunek podziału wynosi 1:3 do 1:5, a gęstość wysiewu 1–2 × 10<sup>4</sup> komórek/cm<sup>2</sup>. Pożywkę wymienia się 2–3 razy w tygodniu.

## Organism

Makak rezus

## Tissue

Naczyniówka, siatkówka

## Disease

Prawidłowy śródbłonek naczyń i siatkówki (płodowy; nie nowotworowy)

## Metastatic site

Nie dotyczy (normalna linia komórek śródbłonka naczyń i siatkówki płodu)

## Applications

Badania nad angiogenezą oczną; unaczynienie siatkówki i naczyń; ocena terapii anti-VEGF (bewacyzumab, ranibizumab); modelowanie AMD i retinopatii cukrzycowej; testy tworzenia rurek; przepuszczalność naczyń; model śródbłonka siatkówki u naczelnych z rządu NHP

## Charakterystyka

## Age

Płód

## Gender

Płeć nieokreślona

**Ogniwa RF/6A | 305150**

**Ethnicity** Nie dotyczy (linia komórkowa naczelnych innych niż człowiek; Macaca mulatta)

**Morphology** Podobny do nabłonka

**Cell type** Komórki śródbłonka

**Growth properties** Adherent

**Dane regulacyjne**

**Citation** RF/6A (numer katalogowy Cytion 305150)

**Biosafety level** 1

**NCBI\_TaxID** 9544

**CellosaurusAccession** CVCL\_4552

**GMO Status** Bez modyfikacji genetycznej; linia komórek śródbłonka naczyńiówki siatkówki płodu makaka rezusa typu dzikiego

**Dane biomolekularne**

**Protein expression** Czynniki , fibronektyna

**Obsługa**

**Culture Medium** EMEM (MEM Eagle), w: 2 mM L-glutamina, w: 2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, w: EBSS (numer artykułu Cytion 820100a)

**Supplements** Uzupelnic podloze 10% FBS i 1% NEAA

**Dissociation Reagent** Accutase

**Doubling time** ok. 24–36 godzin

## Ogniwa RF/6A | 305150

<b>Subculturing</b>	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. Odrzuć supernatant, ponownie zawiesić komórki w świeżej pożywce i przenieść je do nowych kolb zawierających już świeżą pożywkę.
<b>Split ratio</b>	od 1 do 5
<b>Seeding density</b>	od 1 do $2 \times 10^4$ komórek/cm <sup>2</sup>
<b>Fluid renewal</b>	2 do 3 razy w tygodniu
<b>Post-Thaw Recovery</b>	Po rozmrożeniu należy wysiać komórki w gęstości $5 \times 10^4$ komórek/cm <sup>2</sup> i odczekać co najmniej 24 godziny, aż komórki przylgną do podłoża, przed pierwszą wymianą pożywki. Nie należy dopuścić do osiągnięcia przez hodowle pełnej konfluencji, ponieważ hamowanie kontaktowe może osłabić fenotyp śródbłonna.
<b>Freeze medium</b>	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.

## Ogniwa RF/6A | 305150

### 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  $-150^{\circ}\text{C}$ , 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  $37^{\circ}\text{C}$  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 probówki 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 zawieszonych, 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

$37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , nawilżona atmosfera.

### Flask Coating

Brak

### Freezing Procedure

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

## Ogniwa RF/6A | 305150

### Shipping Conditions

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

### Storage Conditions

W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiołki w ciekłym azocie w fazie lotnej w temperaturze od  $-150$  do  $-196^{\circ}\text{C}$ . Przechowywanie w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  jest dopuszczalne tylko jako krótki etap przejściowy przed przeniesieniem do ciekłego azotu.

## Kontrola jakości / Profil genetyczny / HLA

### Sterility

Zanieczyszczenie mykoplazmą jest wykluczane 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.