

Bunky MDCK-SIAT1 | 602281**Všeobecné informácie****Description**

Bunková línia MDCK-SIAT1 je modifikovaná verzia buniek Madin-Darbyho psej obličky (MDCK), ktorá je upravená tak, aby exprimovala vyššie hladiny ľudskej 2,6-sialyltransferázy (SIAT1). Tento enzým je zodpovedný za pridávanie kyseliny sialovej v alfa-2,6 väzbe na galaktózu na glykoproteínoch a glykolipidoch. Modifikácia sa vykonala s cieľom zvýšiť expresiu sialových kyselín viazaných na alfa-2,6, ktoré sú primárnymi receptormi pre ľudské chrípkové vírusy. Toto zvýšenie je veľmi dôležité, pretože vďaka nemu sa bunky MDCK-SIAT1 viac podobajú ľudskému epitelu dýchacích ciest, ktorý má prirodzene vysokú koncentráciu týchto receptorov. V dôsledku toho tieto bunky ponúkajú fyziologicky relevantnejší model na štúdium ľudských chrípkových vírusov a ich interakcií s potenciálnymi antivírusovými zlúčeninami.

Jedným z významných využití buniek MDCK-SIAT1 je hodnotenie citlivosti vírusu chrípky na inhibítory neuraminidázy (NAI), ako je napríklad oseltamivir. Vzhľadom na zvýšenú prítomnosť alfa-2,6-viazaných sialových kyselín vykazujú bunky MDCK-SIAT1 lepšiu citlivosť na NAI v porovnaní s nemodifikovanými bunkami MDCK. To z nich robí vynikajúci nástroj na zisťovanie rezistencie voči týmto inhibítorm, najmä u klinických izolátov ľudských chrípkových vírusov s nízkym počtom pasáží. Bunková línia MDCK-SIAT1 umožňuje presnejšie in vitro štúdie účinnosti liečiv a interakcií vírusových receptorov, čo poskytuje cenné poznatky o vývoji antivírusových terapií a mechanizmoch rezistencie.

Organism Psy**Tissue** Obličky**Charakteristika****Breed/Subspecies** Kokeršpaniel**Age** Dospelí**Gender** Ženy**Morphology** Epitelové**Growth properties** Adherent**Regulačné údaje****Citation** MDCK-SIAT1 (katalógové číslo Cytion 602281)**Biosafety level** 2

Bunky MDCK-SIAT1 | 602281**NCBI_TaxID** 9615**CellosaurusAccession** CVCL_Z936**GMO Status** GMO-S1: Táto línia epitelových buniek psej obličky (MDCK-SIAT1) obsahuje konštrukt pcDNA3.1GS kódujúci ľudskú 2,6-sialyltransferázu (SIAT1), ktorý umožňuje expresiu sialylačných vzorcov podobných ľudským. Vložka je stabilne prítomná v bunkách MDCK. Táto klasifikácia platí len v Nemecku a môže sa líšiť v iných krajinách.**Biomolekulárne údaje****Protein expression** Transfekcia ST6 beta-galaktozid alfa-2,6-sialyltransferázou 1 (ST6GAL1, SIAT1)**Spracovanie****Culture Medium** DMEM, w: 4,5 g/l glukózy, w: 4 mM L-glutamínu, w: 3,7 g/l NaHCO₃, w: 1,0 mM pyruvátu sodného (číslo výrobu Cytion 820300a)**Supplements** Doplníte médium o 10% FBS a 1mg/ml G418**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** 21 až 31 hodín**Subculturing** Odstráňte staré médium z adherovaných buniek a premyte ich PBS, ktorý neobsahuje vápnik a horčík. Pre banky T25 použite 3 - 5 ml PBS a pre banky T75 použite 5 - 10 ml. Potom bunky úplne pokryte Accutase, pričom použite 1 - 2 ml pre banky T25 a 2,5 ml pre banky T75. Nechajte bunky inkubovať pri izbovej teplote 8-10 minút, aby sa oddelili. Po inkubácii jemne premiešajte bunky s 10 ml média, aby boli znovu suspendované, a potom ich 3 minúty odstredujte pri 300xg. Supernatant zlikvidujte, bunky znovu rozmiešajte v čerstvom médiu a preneste ich do nových fliaš, ktoré už obsahujú čerstvé médium.**Seeding density** 2 až 4 x 10⁴ buniek/cm²**Fluid renewal** 2 až 3-krát týždenne**Freeze medium** Ako kryokonzervačné médium používame kompletne rastové médium (vrátane FBS) + 10 % DMSO na zabezpečenie primeranej životaschopnosti po rozmrazení alebo CM-1 (katalógové číslo 800100 spoločnosti Cytion), ktoré obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory na zlepšenie regenerácie a zníženie stresu spôsobeného kryom.

Bunky MDCK-SIAT1 | 602281**Thawing and
Culturing Cells**

1. Overte si, že injekčná liekovka zostane pri doručení hlboko zmrazená, pretože bunky sa prepravujú na suchom ľade, aby sa počas prepravy udržala optimálna teplota.
2. Po prijatí buď okamžite uskladnite kryovialku pri teplote nižšej ako -150 °C, aby ste zabezpečili zachovanie bunkovej integrity, alebo prejdite na krok 3, ak je potrebná okamžitá kultivácia.
3. V prípade okamžitej kultivácie injekčnú liekovku rýchlo rozmrazte ponorením do vodného kúpeľa s teplotou 37 °C s čistou vodou a antimikrobiálnym prostriedkom, pričom ju jemne miešajte 40 - 60 sekúnd, kým nezostane malý ľadový chumáč.
4. Všetky ďalšie kroky vykonajte v sterilných podmienkach v prietokovom digestore a pred otvorením kryovialku dezinfikujte 70 % etanolom.
5. Opatrne otvorte dezinfikovanú fľaštičku a preneste bunkovú suspenziu do 15 ml centrifugačnej skúmavky obsahujúcej 8 ml kultivačného média s izbovou teplotou a jemne premiešajte.
6. Zmes odstreďujte pri 300 x g počas 3 minút, aby sa bunky oddelili, a opatrne zlikvidujte supernatant obsahujúci zvyšky zmrazovacieho média.
7. Pelet buniek jemne resuspendujte v 10 ml čerstvého kultivačného média. V prípade adherentných buniek rozdeľte suspenziu medzi dve kultivačné banky T25; v prípade suspenzných kultúr preneste všetko médium do jednej banky T25, aby ste podporili účinnú interakciu a rast buniek.
8. Dodržiavajte zavedené subkultivačné protokoly na nepretržitý rast a udržiavanie bunkovej línie, čím sa zabezpečia spoľahlivé výsledky experimentov.

**Incubation
Atmosphere**

37 °C, 5 % CO_2 , zvlhčená atmosféra.

Flask Coating

Žiadne

**Freezing
Procedure**

Kryokonzervované bunkové línie sa prepravujú na suchom ľade v overených, izolovaných obaloch s dostatočným množstvom chladiva na udržanie teploty približne -78 °C počas celej prepravy. Po prijatí ihneď skontrolujte obal a bezodkladne premiestnite injekčné liekovky do vhodného skladu.

**Shipping
Conditions**

Kryokonzervované bunkové línie sa prepravujú na suchom ľade v overených, izolovaných obaloch s dostatočným množstvom chladiva na udržanie teploty približne -78 °C počas celej prepravy. Po prijatí ihneď skontrolujte obal a bezodkladne premiestnite injekčné liekovky do vhodného skladu.

Bunky MDCK-SIAT1 | 602281

Storage Conditions

Na dlhodobé uchovávanie umiestnite injekčné liekovky do kvapalnej fázy dusíka v pare pri teplote približne -150 až -196 °C. Skladovanie pri teplote -80 °C je prijateľné len ako krátky prechodný krok pred presunom do tekutého dusíka.

Kontrola kvality / Genetický profil / HLA

Sterility

Kontaminácia mykoplazmami sa vylučuje pomocou testov založených na PCR a metód detekcie mykoplazmiem založených na luminiscencii.

Aby sa zabezpečilo, že nedošlo ku kontaminácii baktériami, hubami alebo kvasinkami, bunkové kultúry sa denne vizuálne kontrolujú.