

**Bunky RF/6A | 305150****Všeobecné informácie****Description**

RF/6A je bunková línia endoteliálnych buniek sietnice a cievnatky makaka rhesus (*Macaca mulatta*), získaná z tkaniva cievnatky a sietnice plodu. Táto línia je zaregistrovaná v databáze Cellosaurus pod označením CVCL\_4552 a rastie vo forme adhezívnej monovrstvy s morfológiou podobnou epitelu. Bunky RF/6A si zachovávajú kľúčové endoteliálne charakteristiky, vrátane expresie faktora VIII (von Willebrandovho faktora), fibronektínu a Weibel-Paladeho granúl, ktoré sú detekovateľné pomocou elektrónovej mikroskopie – pričom práve posledné menované potvrdzujú ich endoteliálnu identitu. Táto línia bola pôvodne vytvorená na účely štúdia vaskularizácie sietnice a cievnatky a bola široko prijatá ako model endotelu primátov pre výskum očnej angiogenézy.

RF/6A je použiteľná vo výskume očnej angiogenézy, pri štúdiách vaskularizácie sietnice a cievnatky, pri hodnotení antiangiogénnych látok (inhibítory VEGF, bevacizumab, ranibizumab), modelovanie vekovej makulárnej degenerácie (AMD), biológiu diabetickej retinopatie a hodnotenie vaskulárnej permeability v mikroprostredí oka. Vďaka pôvodu z neludských primátov (NHP) je RF/6A bližšia k biológii ciev sietnice človeka než endoteliálne modely hlodavcov, najmä pri štúdiách zahŕňajúcich reakcie na izoformy VEGF špecifické pre primáty a oftalmologickú farmakológiu. Táto línia sa bežne používa v testoch tvorby cievných trubíc, testoch migrácie a experimentoch so stimuláciou VEGF.

RF/6A sa kultivuje ako adhezívna kultúra v médiu EMEM doplnenom o 10 % FBS a 1 % NEAA pri teplote 37 °C vo zvlhčenej atmosfére s 5 % CO<sub>2</sub>. Bunky sa subkultivujú pomocou Accutase pri 70–80 % konfluencii, aby sa zabránilo kontaktnej inhibícii a strate endoteliálneho fenotypu. Pomer rozdelenia je 1:3 až 1:5, hustota výsevu 1–2 × 10<sup>4</sup> buniek/cm<sup>2</sup>. Médium sa obnovuje 2–3-krát týždenne.

**Organism**

Makak rhesus

**Tissue**

Cievnatka, sietnica

**Disease**

Normálne endotélium sietnice a cievnatky (fetálny; netumorigénny)

**Metastatic site**

Neplatí (normálna bunková línia endoteliálnych buniek choroidálnej vrstvy sietnice plodu)

**Applications**

Výskum očnej angiogenézy; vaskularizácia sietnice a cievnatky; hodnotenie anti-VEGF terapie (bevacizumab, ranibizumab); modelovanie AMD a diabetickej retinopatie; testy tvorby cievných trubíc; vaskulárna permeabilita; model endotelu sietnice primátov z rodu NHP

**Charakteristika****Age**

Plod

**Gender**

Pohlavie nešpecifikované

**Ethnicity**Neplatí (bunka z primáta iného ako človek; *Macaca mulatta*)

**Bunky RF/6A | 305150****Morphology** Epitelu podobné**Cell type** Endotelové bunky**Growth properties** Adherent**Regulačné údaje****Citation** RF/6A (katalógové číslo Cytion 305150)**Biosafety level** 1**NCBI\_TaxID** 9544**CellosaurusAccession** CVCL\_4552**GMO Status** Bez genetickej modifikácie; bunková línia endoteliálnych buniek choroidálnej vrstvy sietnice plodu makaka rhesus divokého typu**Biomolekulárne údaje****Protein expression** Faktor , fibronektín**Spracovanie****Culture Medium** EMEM (MEM Eagle), w: 2 mM L-Glutamín, w: 2,2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, w: EBSS (Cytion číslo článku 820100a)**Supplements** Doplňte médium o 10% FBS a 1% NEAA**Dissociation Reagent** Accutase**Doubling time** približne 24 až 36 hodín

## Bunky RF/6A | 305150

**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.

**Split ratio** 1 až 5

**Seeding density** 1 až  $2 \times 10^4$  buniek/cm<sup>2</sup>

**Fluid renewal** 2 až 3-krát týždenne

**Post-Thaw Recovery** Po rozmrazení naneste bunky na kultivačné misky v hustote  $5 \times 10^4$  buniek/cm<sup>2</sup> a pred prvou výmenou živného média počkajte aspoň 24 hodín, aby sa bunky priľnuli. Nedovoľte, aby kultúry dosiahli úplnú konfluenciu, pretože kontaktná inhibícia môže oslabiť endoteliálny fenotyp.

**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 RF/6A | 305150****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 %  $\text{CO}_2$ , 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 RF/6A | 305150

### 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.