

PLAT-E клетки | 305855

Обща информация

Description

Plat-E (Platinum-E) е клетъчна линия за опаковане на ретровируси, създадена на базата на човешки ембрионални бъбречни клетки 293T. Тя е разработена с цел да предостави стабилна и ефективна система за временно производство на екотропни ретровируси с висок титър. Клетъчната линия е конструирана с помощта на нови конструкции за опаковане, при които експресията на вирусните структурни гени – gag-pol и env – се управлява от човешкия EF1α промотор, който е значително по-мощен в 293T клетките, отколкото конвенционалният MuLV промотор с дълъг терминален повторен елемент (LTR). Този дизайн осигурява стабилна транскрипционна активност и поддържа високо ниво на производство на вирусните компоненти, необходими за ефективното сглобяване и опаковане на ретровируса.

Клетките Plat-E бяха генерирани чрез последователна стабилна трансфекция на конструкциите рEnv-IRES-purog и рGag-pol-IRES-bsr, които свързват вирусните гени с маркери за антибиотична резистентност чрез вътрешни сайтове за влизане в рибозомата (IRES). Тази конфигурация гарантира, че само клетките, експресиращи есенциалните вирусни гени, придобиват антибиотична резистентност, което позволява селекция на субклони с висока експресия. Получената линия Plat-E последователно произвежда ретровируси с титри до 1×10^7 инфекциозни единици на милилитър в продължение на поне четири месеца, когато се култивира при двойна селекция с пурамицин и бластицидин. Анализи чрез Northern blot, обратна транскриптазна активност и проточна цитометрия потвърдиха, че Plat-E проявява значително по-висока експресия на gag-pol и env в сравнение с предшествващи линии за опаковане като Bosc23 и Phoenix-E.

Архитектурата на Plat-E минимизира риска от генериране на ретровирус, способен на репликация (RCR), като ограничава опаковъчните конструкции само до необходимите кодиращи региони на вирусните структурни гени и ги разделя на различни плазмиди. Този дизайн изисква поне три рекомбинационни събития за производството на RCR, като по този начин повишава биологичната безопасност. Plat-E се е доказал като полезен в приложения за генен трансфер, включително ефективна трансдукция на първични клетки като Т-клетки и мастоцити. Неговата производителност и дългосрочна стабилност го правят надеждна платформа за производство на ретровирусни вектори както в фундаменталните изследвания, така и в предклиничното разработване на генна терапия.

Organism Човек

Tissue Бъбрек на плода

Synonyms Платина-E

Характеристики

Age Плод

Gender Жена

PLAT-E клетки | 305855

Growth properties

Придържачи се

Регулаторни данни**Citation**

PLAT-E (каталожен номер на Cytion 305855)

Biosafety level

1

NCBI_TaxID

9606

CellosaurusAccession

CVCL_B488

GMO Status

GMO-S1: Тази клетъчна линия за опаковане на ретровируси (PLAT-E) съдържа конструкции, кодиращи gag-pol и env под контрола на промотора EF1 α , което позволява производството на екотропни ретровирусни частици. Модификациите са стабилно налични в клетки, произхождащи от HEK293T. Тази класификация важи само на територията на Германия и може да се различава в други държави.

Биомолекулярни данни**Mutational profile****Работа с****Culture Medium**RPMI 1640, w: 2,0 mM стабилен глутамин, w: 2,0 g/L NaHCO₃ (номер на статията в Cytion 820700a)**Supplements**

Допълнете средата с 10% FBS

Dissociation Reagent

Accutase

Seeding densityот 1 до 4×10^4 клетки/cm²**Fluid renewal**

2 до 3 пъти седмично

PLAT-E клетки | 305855**Freeze medium**

Като среда за криоконсервация използваме пълна среда за растеж (включително FBS) + 10% DMSO за адекватна жизнеспособност след размразяване или CM-1 (каталожен номер 800100 на Cytion), която включва оптимизирани осмопротектори и метаболитни стабилизатори за подобряване на възстановяването и намаляване на криоиндуцирания стрес.

Thawing and Culturing Cells

1. Уверете се, че флаконът остава дълбоко замразен при доставката, тъй като клетките се транспортират със сух лед, за да се поддържат оптимални температури по време на транспортирането.
2. При получаване или съхранявайте незабавно криовиолата при температури под $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, за да осигурите запазване на клетъчната цялост, или преминете към стъпка 3, ако е необходимо незабавно култивиране.
3. За незабавно култивиране бързо размразете флакона, като го потопите във водна баня с чиста вода и антимикуробен агент с температура $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, като разбърквате внимателно в продължение на 40-60 секунди, докато остане малка ледена бучка.
4. Извършвайте всички следващи стъпки при стерилни условия в аспиратор, като преди отваряне дезинфекцирате криовиолата със 70% етанол.
5. Внимателно отворете дезинфекцирания флакон и прехвърлете клетъчната суспензия в 15 ml центрофужна епруветка, съдържаща 8 ml хранителна среда със стайна температура, като разбърквате внимателно.
6. Центрофугирайте сместа при $300 \times g$ в продължение на 3 минути, за да отделите клетките, и внимателно изхвърлете супернатантата, съдържаща остатъчна замразяваща среда.
7. Внимателно ресуспендирайте клетъчната пелета в 10 ml прясна хранителна среда. За адхезивни клетки разделете суспензията между две колби T25; за суспензионни култури прехвърлете цялата среда в една колба T25, за да стимулирате ефективното взаимодействие и растеж на клетките.
8. Придържайте се към установените протоколи за субкултивиране за непрекъснат растеж и поддържане на клетъчната линия, като гарантирате надеждни експериментални резултати.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , овлажнена атмосфера.

Flask Coating

Няма

PLAT-E клетки | 305855

Shipping Conditions

Криоконсервираните клетъчни линии се транспортират върху сух лед във валидирана, изолирана опаковка с достатъчно хладилен агент, за да се поддържа приблизително -78°C по време на транспортирането. При получаването незабавно прегледайте опаковката и незабавно прехвърлете флаконите за подходящо съхранение.

Storage Conditions

За дълготрайно съхранение поставете флаконите в течен азот в парна фаза при температура около -150 до -196°C . Съхранението при -80°C е приемливо само като кратък междинен етап преди прехвърлянето в течен азот.

Контрол на качеството / Генетичен профил / HLA

Sterility

Замърсяването с микоплазма се изключва както чрез PCR-базирани анализи, така и чрез луминесцентни методи за откриване на микоплазма.

За да се гарантира, че няма бактериално, гъбично или дрождево замърсяване, клетъчните култури се подлагат на ежедневни визуални проверки.