

PLAT-E buňky | 305855

Obecné informace

Description

Plat-E (Platinum-E) je buněčná linie pro balení retrovirů, která byla vyvinuta na bázi lidských embryonálních ledvinových buněk 293T. Byla vyvinuta s cílem poskytnout stabilní a účinný systém pro přechodnou produkci ekotropních retrovirů s vysokým titrem. Buněčná linie byla vytvořena pomocí nových konstrukcí pro balení, ve kterých je exprese virových strukturálních genů – gag-pol a env – řízena lidským promotorem EF1 α , který je v buňkách 293T podstatně účinnější než konvenční promotor MuLV s dlouhým terminálním opakováním (LTR). Tento design zajišťuje robustní transkripční aktivitu a podporuje vysokou úroveň produkce virových komponent nezbytných pro účinnou sestavu a balení retrovirů.

Buňky Plat-E byly vygenerovány postupnou stabilní transfekcí konstruktů pEnv-IRES-puro a pGag-pol-IRES-bsd, které propojují virové geny s markery antibiotické rezistence prostřednictvím interních ribozomových vstupních míst (IRES). Tato konfigurace zaručuje, že pouze buňky exprimující esenciální virové geny získají také antibiotickou rezistenci, což umožňuje selekci subklonů s vysokou expresí. Výsledná linie Plat-E konzistentně produkuje retroviry s titry až 1×10^7 infekčních jednotek na mililitr po dobu nejméně čtyř měsíců při kultivaci v duální selekci s puromycinem a blasticidinem. Analýzy Northern blot, aktivity reverzní transkriptázy a průtokové cytometrie potvrdily, že Plat-E vykazuje významně vyšší expresi gag-pol a env než předchozí balicí linie, jako jsou Bosc23 a Phoenix-E.

Architektura Plat-E minimalizuje riziko vzniku replikačně kompetentního retroviru (RCR) tím, že omezuje balicí konstrukty pouze na nezbytné kódující oblasti virových strukturálních genů a odděluje je na různé plazmidy. Tento design vyžaduje alespoň tři rekombinační události k produkci RCR, čímž zvyšuje biologickou bezpečnost. Plat-E se osvědčil v aplikacích genového přenosu, včetně účinné transdukce primárních buněk, jako jsou T buňky a žírné buňky. Jeho výkon a dlouhodobá stabilita z něj činí spolehlivou platformu pro produkci retrovirových vektorů jak v základním výzkumu, tak v předklinickém vývoji genové terapie.

Organism Člověk

Tissue Fetální ledvina

Synonyms Platinum-E

Charakteristika

Age Plod

Gender Ženy

Growth properties Adherentní

Regulační údaje

Citation PLAT-E (katalogové číslo Cytion 305855)

PLAT-E buňky | 305855

Biosafety level 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_B488**GMO Status** GMO-S1: Tato retrovirová balící buněčná linie (PLAT-E) obsahuje konstrukty kódující geny gag-pol a env pod kontrolou promotoru EF1 α , což umožňuje produkci ekotropních retrovirových částic. Tyto modifikace jsou stabilně přítomny v buňkách odvozených od linie HEK293T. Tato klasifikace platí pouze v Německu a v jiných zemích se může lišit.**Biomolekulární data****Mutational profile****Zpracování****Culture Medium** RPMI 1640, w: 2,0 mM stabilní glutamin, w: 2,0 g/l NaHCO₃ (číslo výrobku Cytion 820700a)**Supplements** Doplněte médium o 10% FBS**Dissociation Reagent** Accutase**Seeding density** 1 až 4 × 10⁴ buněk/cm²**Fluid renewal** 2 až 3krát týdně**Freeze medium** Jako kryokonzervační médium používáme kompletní růstové médium (včetně FBS) + 10 % DMSO pro zajištění dostatečné životaschopnosti po rozmrazení nebo CM-1 (katalogové číslo 800100 společnosti Cytion), které obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory pro zlepšení regenerace a snížení stresu způsobeného kryo.

PLAT-E buňky | 305855**Thawing and
Culturing Cells**

1. Ověřte si, že lahvička zůstane při dodání hluboce zmrazená, protože buňky se přepravují na suchém ledu, aby se během přepravy udržely optimální teploty.
2. Po obdržení kryovialku buď okamžitě uložte při teplotě nižší než -150 °C, abyste zajistili zachování buněčné integrity, nebo přejděte ke kroku 3, pokud je nutná okamžitá kultivace.
3. Pro okamžitou kultivaci rychle rozmrazte lahvičku ponořením do vodní lázně o teplotě 37 °C s čistou vodou a antimikrobiálním prostředkem a jemně ji míchejte po dobu 40-60 sekund, dokud nezůstane malý ledový chuchvalec.
4. Všechny další kroky provádějte za sterilních podmínek v průtokové digestoři a před otevřením kryovialku dezinfikujte 70% ethanolem.
5. Opatrně otevřete dezinfikovanou lahvičku a přeneste buněčnou suspenzi do 15 ml centrifugační zkumavky obsahující 8 ml kultivačního média o pokojové teplotě a jemně promíchejte.
6. Směs odstředujte při 300 x g po dobu 3 minut, aby se buňky oddělily, a supernatant obsahující zbytky mrazicího média opatrně zlikvidujte.
7. Pelety buněk jemně resuspendujte v 10 ml čerstvého kultivačního média. U adherentních buněk rozdělte suspenzi mezi dvě kultivační baňky T25; u suspenzních kultur přeneste veškeré médium do jedné baňky T25, abyste podpořili účinnou interakci a růst buněk.
8. Dodržujte zavedené subkultivační protokoly pro kontinuální růst a udržování buněčné linie, čímž zajistíte spolehlivé výsledky experimentů.

**Incubation
Atmosphere**

37 °C, 5 % CO_2 , zvlhčená atmosféra.

Flask Coating

Žádný

**Shipping
Conditions**

Kryokonzervované buněčné linie se přepravují na suchém ledu v ověřených, izolovaných obalech s dostatečným množstvím chladiva, aby se po celou dobu přepravy udržovala teplota přibližně -78 °C. Po obdržení ihned zkontrolujte obal a neprodleně přeneste lahvičky do vhodného skladu.

**Storage
Conditions**

Pro dlouhodobé uchování umístěte lahvičky do kapalného dusíku v plynné fázi při teplotě přibližně -150 až -196 °C. Skladování při -80 °C je přijatelné pouze jako krátký přechodný krok před přemístěním do kapalného dusíku.

Kontrola kvality / Genetický profil / HLA

PLAT-E buňky | 305855

Sterility

Kontaminace mykoplazmaty je vyloučena jak pomocí testů založených na PCR, tak pomocí luminiscenčních metod detekce mykoplazmy.

Aby se zajistilo, že nedojde ke kontaminaci bakteriemi, plísněmi nebo kvasinkami, jsou buněčné kultury denně podrobovány vizuální kontrolám.