

Buňky AAV-293 | 305127**Obecné informace****Description**

Buněčná linie AAV-293 je trvalá linie vytvořená z primární embryonální lidské ledviny transformované DNA lidského adenoviru typu 5. Geny kódované oblastí E1 adenoviru (E1a a E1b) jsou v těchto buňkách exprimovány a podílejí se na transaktivaci virových promotorů, což těmto buňkám umožňuje produkovat vysoké hladiny proteinů.

AAV-293 je odvozen z rodičovské buněčné linie 293. Díky klonování a několika kolům testování je AAV-293 specificky selektován pro vysokou úroveň produkce AAV v systému bez pomocníků. Oproti běžným buňkám 293 nabízí několik výhod: Větší plocha buněčného povrchu vede k vyšší transfekci a lepšímu výtěžku AAV.

Výhodou je zploštělá morfologie, pevné uchycení na kulturační desce a buňky jsou ideální pro velkoplošné kultivace a produkci AAV. Adenoasociovaný virus (AAV) patří do čeledi Parvoviridae, skupiny virů, která patří mezi nejmenší jednořetězcové a neobalené DNA viry.

Dosud bylo zaznamenáno devět různých sérotypů AAV. AAV může infikovat dělicí se i nedělicí se buňky a může se udržovat v lidské hostitelské buňce, což vytváří potenciál pro dlouhodobý přenos genů. Rekombinantní AAV-2 je nejběžnějším sérotypem používaným pro přenos genů a lze jej produkovat ve vysokých titrech s pomocným virem nebo buňkami AAV-293.

Organism Člověk**Tissue** Embryonální ledvina**Synonyms** AAV293**Charakteristika****Age** Plod**Gender** Ženy**Morphology** Epitelové**Growth properties** Adherentní**Regulační údaje****Citation** AAV-293 (katalogové číslo Cytion 305127)**Biosafety level** 1

Buňky AAV-293 | 305127**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_6871**GMO Status** GMO-S1: Tato linie AAV-293 odvozená od HEK293 obsahuje klonální modifikace podporující produkci vektorů AAV. Tato klasifikace platí pouze v Německu a jinde se může lišit.**Biomolekulární data****Zpracování****Culture Medium** DMEM, w: 4,5 g/l glukózy, w: 4 mM L-glutaminu, w: 3,7 g/l NaHCO₃, w: 1,0 mM pyruvátu sodného (číslo výrobku Cytion 820300a)**Supplements** Doplněte médium o 10 % FBS, 0,1 mM NEAA**Dissociation Reagent** Accutase**Subculturing** Odstraňte staré médium z adherovaných buněk a promyjte je PBS bez vápníku a hořčíku. Pro baňky T25 použijte 3-5 ml PBS a pro baňky T75 5-10 ml. Poté buňky zcela zakryjte přípravkem Accutase, přičemž použijte 1-2 ml pro baňky T25 a 2,5 ml pro baňky T75. Nechte buňky inkubovat při pokojové teplotě po dobu 5 minut, aby se oddělily. Po inkubaci jemně promíchejte buňky s 10 ml média, aby byly znovu suspendovány, a poté je odstředte při 300xg po dobu 3 minut. Supernatant vyhodte, buňky znovu rozpustte v čerstvém médiu a přeneste je do nových baněk, které již obsahují čerstvé médium.**Split ratio** 1:3 až 1:5**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 kryem.

Buňky AAV-293 | 305127

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

Freezing Procedure

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.

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.

Buňky AAV-293 | 305127

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

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 vizuálním kontrolám.