

Κύτταρα PLAT-E | 305855

Γενικές πληροφορίες

Description

Το Plat-E (Platinum-E) είναι μια κυτταρική σειρά συσκευασίας ρετροϊών που έχει κατασκευαστεί με βάση τα ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα 293T. Αναπτύχθηκε με σκοπό να προσφέρει ένα σταθερό και αποδοτικό σύστημα για την προσωρινή παραγωγή ρετροϊών υψηλού τίτλου, του τύπου ecotropic. Η κυτταρική σειρά κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας καινοτόμα κατασκευάσματα συσκευασίας, στα οποία η έκφραση των δομικών γονιδίων του ιού - gag-pol και env - καθοδηγείται από τον ανθρώπινο προαγωγέα EF1α, ο οποίος είναι σημαντικά πιο ισχυρός στα κύτταρα 293T από τον συμβατικό προαγωγέα MuLV long terminal repeat (LTR). Αυτός ο σχεδιασμός εξασφαλίζει ισχυρή μεταγραφική δραστηριότητα και υποστηρίζει την παραγωγή υψηλού επιπέδου των ιικών συστατικών που είναι απαραίτητα για την αποτελεσματική συναρμολόγηση και συσκευασία του ρετροϊού.

Τα κύτταρα Plat-E δημιουργήθηκαν μέσω διαδοχικής σταθερής μεταμόλυνσης των κατασκευασμάτων pEnv-IRES-puro και pGag-pol-IRES-bsr, τα οποία συνδέουν τα ιικά γονίδια με δείκτες αντοχής στα αντιβιοτικά μέσω εσωτερικών θέσεων εισόδου στο ριβοσώμα (IRES). Αυτή η διαμόρφωση εγγυάται ότι μόνο τα κύτταρα που εκφράζουν τα απαραίτητα ιικά γονίδια αποκτούν επίσης αντοχή στα αντιβιοτικά, επιτρέποντας την επιλογή υποκλώνων υψηλής έκφρασης. Η προκύπτουσα σειρά Plat-E παράγει σταθερά ρετροϊούς με τίτλους έως 1×10^7 μονάδες μόλυνσης ανά χιλιοστόλιτρο για τουλάχιστον τέσσερις μήνες όταν καλλιεργείται υπό διπλή επιλογή με πουρομυκίνη και βλαστικιδίνη. Αναλύσεις Northern blot, δραστηριότητας αντίστροφης μεταγραφάσης και κυτταρομετρίας ροής επιβεβαίωσαν ότι το Plat-E εμφανίζει σημαντικά υψηλότερη έκφραση gag-pol και env σε σύγκριση με προηγούμενες σειρές συσκευασίας όπως το Bosc23 και το Phoenix-E.

Η αρχιτεκτονική του Plat-E ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο δημιουργίας ρετροϊού ικανό για αναπαραγωγή (RCR) περιορίζοντας τα κατασκευάσματα συσκευασίας μόνο στις απαραίτητες κωδικοποιητικές περιοχές των δομικών γονιδίων του ιού και διαχωρίζοντάς τα σε διαφορετικά πλασμίδια. Αυτός ο σχεδιασμός απαιτεί τουλάχιστον τρία γεγονότα ανασυνδυασμού για την παραγωγή RCR, ενισχύοντας έτσι τη βιοασφάλεια. Το Plat-E έχει αποδειχθεί χρήσιμο σε εφαρμογές μεταφοράς γονιδίων, συμπεριλαμβανομένης της αποτελεσματικής μεταγωγής πρωτογενών κυττάρων, όπως τα T κύτταρα και τα μαστοκύτταρα. Η απόδοσή του και η μακροπρόθεσμη σταθερότητά του το καθιστούν μια αξιόπιστη πλατφόρμα για την παραγωγή ρετροϊικών φορέων τόσο στη βασική έρευνα όσο και στην προκλινική ανάπτυξη γονιδιακής θεραπείας.

Organism Ανθρώπινο

Tissue Νεφρό εμβρύου

Synonyms Platinum-E

Χαρακτηριστικά

Age Έμβρυο

Gender Γυναίκα

Growth properties Προσκολλημένο

Κύτταρα PLAT-E | 305855

Ρυθμιστικά δεδομένα

Citation	PLAT-E (αριθμός καταλόγου Cytion 305855)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_B488
GMO Status	GMO-S1: Αυτή η κυτταρική σειρά συσκευασίας ρετροϊών (PLAT-E) περιέχει κατασκευάσματα που κωδικοποιούν τα γονίδια gag-pol και ενν υπό τον έλεγχο του προαγωγού EF1α, υποστηρίζοντας την παραγωγή εκτροπικών ρετροϊικών σωματιδίων. Οι τροποποιήσεις αυτές υπάρχουν σταθερά σε κύτταρα που προέρχονται από την σειρά HEK293T. Αυτή η ταξινόμηση ισχύει μόνο στη Γερμανία και ενδέχεται να διαφέρει σε άλλες χώρες.

Βιομοριακά δεδομένα

Mutational profile	
---------------------------	--

Χειρισμός

Culture Medium	RPMI 1640, w: 2,0 mM σταθερής γλουταμίνης, w: 2,0 g/L NaHCO ₃ (αριθμός άρθρου Cytion 820700a)
Supplements	Συμπληρώστε το μέσο με 10% FBS
Dissociation Reagent	Accutase
Seeding density	1 έως 4×10^4 κύτταρα/cm ²
Fluid renewal	2 έως 3 φορές την εβδομάδα
Freeze medium	Ως μέσο κρυοσυντήρησης, χρησιμοποιούμε πλήρες μέσο ανάπτυξης (συμπεριλαμβανομένου του FBS) + 10% DMSO για επαρκή βιωσιμότητα μετά την απόψυξη, ή CM-1 (αριθμός καταλόγου Cytion 800100), το οποίο περιλαμβάνει βελτιστοποιημένα ωσμοπροστατευτικά και μεταβολικούς σταθεροποιητές για την ενίσχυση της ανάκαμψης και τη μείωση του στρες που προκαλείται από την κρυοσυντήρηση.

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

1. Επιβεβαιώστε ότι το φιαλίδιο παραμένει βαθιά παγωμένο κατά την παράδοση, καθώς τα κύτταρα αποστέλλονται σε ξηρό πάγο για να διατηρούνται οι βέλτιστες θερμοκρασίες κατά τη μεταφορά.
2. Κατά την παραλαβή, είτε αποθηκεύστε το κρυσταλλικό αμέσως σε θερμοκρασίες κάτω των -150°C για να διασφαλίσετε τη διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας, είτε προχωρήστε στο βήμα 3 εάν απαιτείται άμεση καλλιέργεια.
3. Για άμεση καλλιέργεια, αποψύξτε γρήγορα το φιαλίδιο βυθίζοντάς το σε υδατόλουτρο 37°C με καθαρό νερό και αντιμικροβιακό παράγοντα, αναδεύοντας απαλά για 40-60 δευτερόλεπτα μέχρι να παραμείνει ένα μικρό σβόλο πάγου.
4. Εκτελέστε όλα τα επόμενα βήματα υπό αποστειρωμένες συνθήκες σε απορροφητήρα ροής, απολυμαίνοντας το κρυσταλλικό με 70% αιθανόλη πριν από το άνοιγμα.
5. Ανοίξτε προσεκτικά το απολυμασμένο φιαλίδιο και μεταφέρετε το εναιώρημα των κυττάρων σε ένα σωληνάριο φυγοκέντρησης των 15 ml που περιέχει 8 ml θρεπτικού μέσου καλλιέργειας σε θερμοκρασία δωματίου, αναμειγνύοντας απαλά.
6. Φυγοκεντρίστε το μείγμα στα 300 x g για 3 λεπτά για να διαχωριστούν τα κύτταρα και απορρίψτε προσεκτικά το υπερκείμενο που περιέχει το υπόλοιπο μέσο κατάψυξης.
7. Επανασυσσωματώστε απαλά το κυτταρικό σφαιρίδιο σε 10 ml φρέσκου μέσου καλλιέργειας. Για προσκολλημένα κύτταρα, μοιράστε το εναιώρημα σε δύο φιάλες καλλιέργειας T25- για καλλιέργειες εναιωρήματος, μεταφέρετε όλο το μέσο σε μία φιάλη T25 για να προωθήσετε την αποτελεσματική αλληλεπίδραση και ανάπτυξη των κυττάρων.
8. Τηρείτε τα καθιερωμένα πρωτόκολλα υποκαλλιέργειας για τη συνεχή ανάπτυξη και διατήρηση της κυτταρικής σειράς, εξασφαλίζοντας αξιόπιστα πειραματικά αποτελέσματα.

**Incubation
Atmosphere**

37°C , 5% CO_2 , υγραποιημένη ατμόσφαιρα.

Flask Coating

Κανένα

**Shipping
Conditions**

Οι κρυσταλλοποιημένες κυτταρικές σειρές αποστέλλονται σε ξηρό πάγο σε επικυρωμένη, μονωμένη συσκευασία με επαρκές ψυκτικό μέσο για τη διατήρηση περίπου των -78°C καθ' όλη τη διάρκεια της μεταφοράς. Κατά την παραλαβή, επιθεωρήστε αμέσως τον περιέκτη και μεταφέρετε τα φιαλίδια χωρίς καθυστέρηση στην κατάλληλη αποθήκη.

Κύτταρα PLAT-E | 305855

Storage Conditions

Για μακροχρόνια συντήρηση, τοποθετήστε τα φιαλίδια σε υγρό άζωτο σε φάση ατμών σε θερμοκρασία περίπου -150 έως -196 °C. Η αποθήκευση στους -80 °C είναι αποδεκτή μόνο ως σύντομο ενδιάμεσο βήμα πριν από τη μεταφορά σε υγρό άζωτο.

Ποιοτικός έλεγχος / Γενετικό προφίλ / HLA

Sterility

Η μόλυνση από μυκόπλασμα αποκλείεται με τη χρήση τόσο των δοκιμασιών που βασίζονται στην PCR όσο και των μεθόδων ανίχνευσης μυκοπλάσματος με βάση τη φωταύγεια.

Για να διασφαλιστεί ότι δεν υπάρχει μόλυνση από βακτήρια, μύκητες ή ζύμες, οι κυτταροκαλλιέργειες υποβάλλονται σε καθημερινές οπτικές επιθεωρήσεις.