

PLAT-E rakud | 305855

Üldine teave

Description

Plat-E (Platinum-E) on retroviiruste pakkimiseks mõeldud rakuliin, mis on loodud inimese embrüonaalsete neerurakkude 293T rakuliini baasil. See töötati välja, et pakkuda stabiilset ja tõhusat süsteemi kõrge tiitriga ekotroopsete retroviiruste ajutiseks tootmiseks. Rakuliin konstrueeriti uude pakkimiskonstruktsioonide abil, milles viiruse struktuurigeenide – gag-pol ja env – ekspressiooni juhib inimese EF1 α promootor, mis on 293T-rakkudes oluliselt tugevam kui tavapärase MuLV pikk terminaalne kordus (LTR) promootor. Selline disain tagab tugeva transkriptsioonilise aktiivsuse ja toetab retroviiruse tõhusaks kokkupanekuks ja pakkimiseks vajalike viiruskomponentide kõrgetasemelist tootmist.

Plat-E rakud loodi pEnv-IRES-puror ja pGag-pol-IRES-bsr konstruktsioonide järjestikuse stabiilse transfektsiooni teel, mis ühendavad viirusgeenid antibiootikumiresistentsuse markeritega sisemiste ribosomaalsete sisenemiskohtade (IRES) kaudu. See konfiguratsioon tagab, et ainult olulisi viirusgeene ekspresseerivad rakud omandavad ka antibiootikumiresistentsuse, võimaldades kõrge ekspressiooniga subkloonide selektsiooni. Saadud Plat-E liin toodab järjepidevalt retroviiruseid tiitriga kuni 1×10^7 nakkusohklikku ühikut milliliitri kohta vähemalt nelja kuu jooksul, kui neid kasvatatakse puromütsiini ja blastitsidiini kahekomponentsel selektsioonil. Northern blot, pöördtranskriptaasi aktiivsuse ja volutsütomeetria analüüsid kinnitasid, et Plat-E-l on märkimisväärselt kõrgem gag-pol ja env ekspressioon kui eelkäijatel, nagu Bosc23 ja Phoenix-E.

Plat-E arhitektuur minimeerib replikatsioonivõimelise retroviiruse (RCR) tekkimise riski, piirates pakkimiskonstruktsioone ainult viiruse struktuurigeenide vajalike kodeerivate piirkondadega ja eraldades need erinevatele plasmiididele. See disain nõuab RCR-i tootmiseks vähemalt kolme rekombinatsioonisündmust, parandades seeläbi bioloogilist ohutust. Plat-E on osutunud kasulikuks geenisiirde rakendustes, sealhulgas T-rakkude ja nuumrakkude tõhusas transduktsioonis. Selle toimivus ja pikaajaline stabiilsus teevad sellest usaldusväärse platvormi retroviirusvektorite tootmiseks nii alusuuringutes kui ka prekliinilises geeniteraapia arenduses.

Organism Inimene

Tissue Lote neer

Synonyms Platinum-E

Omadused

Age Lote

Gender Naised

Growth properties Kinnipeetav

Regulatiivsed andmed

PLAT-E rakud | 305855

Citation	PLAT-E (Cytioni katalooginumber 305855)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_B488
GMO Status	GMO-S1: See retroviiruse pakkimisrakuliin (PLAT-E) sisaldab konstruktsioone, mis kodeerivad gag-pol-i ja env-i EF1 α -promootori kontrolli all, võimaldades ekotroopsete retroviirusosakeste tootmist. Need modifikatsioonid on stabiilselt esindatud HEK293T-st pärinevates rakkudes. See klassifikatsioon kehtib ainult Saksamaal ja võib mujal erineda.

Biomolekulaarsed andmed

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

Töötlemine

Culture Medium	RPMI 1640, w: 2,0 mM stabiilne glutamiin, w: 2,0 g/L NaHCO ₃ (Cytioni artikli number 820700a)
Supplements	Täiendada söötme 10% FBS-ga
Dissociation Reagent	Accutase
Seeding density	1–4 × 10 ⁴ rakku/cm ²
Fluid renewal	2 kuni 3 korda nädalas
Freeze medium	Krüosäilitusvedelikusena kasutame täielikku kasvukeskkonda (sh FBS) + 10% DMSO, et tagada piisav elujõulisus pärast sulatamist, või CM-1 (Cytioni katalooginumber 800100), mis sisaldab optimeeritud osmoprotektante ja metaboolseid stabilisaatoreid, et parandada taastumist ja vähendada krüostressi.

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

1. Veenduge, et vial jääb tarnimisel sügavkülmutatud, sest rakud transporditakse kuiva jääga, et säilitada optimaalne temperatuur transpordi ajal.
2. Pärast kättesaamist säilitage krüoviaal kas kohe temperatuuril alla -150°C , et tagada rakkude terviklikkuse säilimine, või jätkake sammuga 3, kui on vaja koheselt kultiveerida.
3. Kohese kultiveerimise korral sulatage viali kiiresti, kastes selle 37°C veevanni puhta vee ja antimikroobse ainega, segades seda õrnalt 40-60 sekundit, kuni alles jääb väike jääklomp.
4. Tehke kõik järgmised toimingud steriilsetes tingimustes vooluhoodis, desinfitseerides krüoviaal enne avamist 70% etanooliga.
5. Avage desinfitseeritud viali ettevaatlikult ja viige rakuksuspensioon ettevaatlikult segades 15 ml tsentrifuugitorusse, mis sisaldab 8 ml toatemperatuuril olevat kasvukeskkonda.
6. Rakkude eraldamiseks tsentrifuugige segu $300 \times g$ juures 3 minutit ja visake ülejäänud külmutusvedelikku sisaldav supernatant ettevaatlikult ära.
7. Resuspendeerige rakupellet ettevaatlikult 10 ml värskes kasvukeskkonnas. Adhereerivate rakkude puhul jagage suspensioon kahe T25 kultuurkolvi vahel; suspensioonikultuuride puhul kandke kogu söötme keskkond ühte T25 kolbi, et soodustada rakkude tõhusat koostoimet ja kasvu.
8. Järgige kehtestatud subkultuuriprotokolle rakuliini jätkuvaks kasvuks ja säilitamiseks, tagades usaldusväärsed katsetulemused.

**Incubation
Atmosphere**

37°C , 5% CO_2 , niisutatud atmosfäär.

Flask Coating

Puudub

**Shipping
Conditions**

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu -78°C . Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige vialid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

**Storage
Conditions**

Pikaajaliseks säilitamiseks asetage vialid aurufaasis vedela lämmastikuga umbes -150 kuni -196°C juures. Säilitamine temperatuuril -80°C on vastuvõetav ainult lühikese vaheetapina enne vedela lämmastikuga üleviimist.

Kvaliteedikontroll / Geneetiline profiil / HLA

PLAT-E rakud | 305855

Sterility

Mükoplasmaakontaminatsioon on välistatud nii PCR-põhiste analüüside kui ka luminesentsil põhinevate mükoplasma tuvastamise meetodite abil.

Bakteriaalse, seene- või pärmsaaste puudumise tagamiseks kontrollitakse rakukultuure iga päev visuaalselt.