

PLAT-E-solut | 305855

Yleisiä tietoja

Description

Plat-E (Platinum-E) on retrovirusten pakkaussolulinja, joka on kehitetty ihmisen alkion munuaisperäisistä 293T-soluista. Se on kehitetty tarjoamaan vakaa ja tehokas järjestelmä korkeatitтерisten, ekotrooppisten retrovirusten tilapäiseen tuotantoon. Solulinja rakennettiin käyttämällä uusia pakkausrakenteita, joissa viruksen rakennegeenien – gag-pol ja env – ilmentymistä ohjaa ihmisen EF1 α -promoottori, joka on huomattavasti tehokkaampi 293T-soluissa kuin perinteinen MuLV:n pitkä terminaalinen toistojakso (LTR) -promoottori. Tämä rakenne takaa vahvan transkriptioaktiivisuuden ja tukee tehokkaaseen retroviruksen kokoamiseen ja pakkaamiseen tarvittavien viruskomponenttien korkeatasoista tuotantoa.

Plat-E-solut tuotettiin peräkkäisellä vakaalla transfektiolla pEnv-IRES-puror- ja pGag-pol-IRES-bsr-rakenteilla, jotka yhdistävät virusgeenit antibiootiresistenssimarkkereihin sisäisten ribosomien sisäänpääsykohdista (IRES) kautta. Tämä kokoonpano takaa, että vain solut, jotka ilmentävät välttämättömiä virusgeenejä, saavat myös antibiootiresistenssin, mikä mahdollistaa korkean ilmentymistason alikloonien valinnan. Tuloksena oleva Plat-E-linja tuottaa johdonmukaisesti retroviruksia, joiden titteri on jopa 1×10^7 infektiivistä yksikköä millilitrassa vähintään neljän kuukauden ajan, kun niitä viljellään puromysiinin ja blasticidiinin kaksoisseulonnassa. Northern blot-, käänteiskopioijaentsyymiaktiivisuus- ja virtausytometria-analysit vahvistivat, että Plat-E:llä on merkittävästi korkeampi gag-pol- ja env-ilmentyminen kuin edeltäjillä, kuten Bosc23- ja Phoenix-E-pakkauslinjoilla.

Plat-E:n rakenne minimoi replikaatiokykyisen retroviruksen (RCR) syntymisen riskin rajoittamalla pakkauskonstruktit vain viruksen rakennegeenien välttämättömiin koodausalueisiin ja erottamalla ne eri plasmideihin. Tämä rakenne vaatii vähintään kolme rekombinaatiotapahtumaa RCR:n tuottamiseksi, mikä parantaa bioturvallisuutta. Plat-E on osoittautunut hyödylliseksi geeninsiirto-ovelluksissa, mukaan lukien T-solujen ja syöttösolujen kaltaisten primaarisolujen tehokas transduktio. Sen suorituskyky ja pitkäaikainen stabiilius tekevät siitä luotettavan alustan retrovirusvektoreiden tuotantoon sekä perustutkimuksessa että prekliinisessä geeniterapian kehityksessä.

Organism Ihminen

Tissue Sikiön munuainen

Synonyms Platinum-E

Ominaisuudet

Age Sikiö

Gender Nainen

Growth properties Tarttuva

Säätelytiedot

PLAT-E-solut | 305855

Citation	PLAT-E (Cytion-tuotenumero 305855)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_B488
GMO Status	GMO-S1: Tämä retroviraalinen pakkaussolulinja (PLAT-E) sisältää rakenteita, jotka koodaavat gag-pol- ja env-geenejä EF1 α -promoottorin ohjauksessa ja mahdollistavat ekstrooppisten retroviraalisten partikkelien tuotannon. Muunnokset ovat vakiintuneesti läsnä HEK293T-solulinjasta peräisin olevissa soluissa. Tämä luokitus koskee ainoastaan Saksaa, ja se voi poiketa muissa maissa.

Biomolekyylitiedot

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

Käsittely

Culture Medium	RPMI 1640, w: 2,0 mM stabiilia glutamiinia, w: 2,0 g/L NaHCO ₃ (Cytionin artikkelinumero 820700a)
Supplements	Täydennetään elatusainetta 10 %:lla FBS:llä
Dissociation Reagent	Accutase
Seeding density	$1-4 \times 10^4$ solua/cm ²
Fluid renewal	2-3 kertaa viikossa
Freeze medium	Kryosäilytysmediana käytämme täydellistä kasvualustaa (mukaan lukien FBS) + 10 % DMSO:ta riittävän sulatuksen jälkeisen elinkelpoisuuden varmistamiseksi tai CM-1:tä (Cytionin luettelonumero 800100), joka sisältää optimoituja osmoprotectantteja ja metabolisia stabilisaattoreita, jotka parantavat elpymistä ja vähentävät kryosäilytyksen aiheuttamaa stressiä.

PLAT-E-solut | 305855

Thawing and Culturing Cells

1. Varmista, että injektiopullo pysyy syväjäädetyttynä toimitettaessa, sillä solut kuljetetaan kuivajäädessä, jotta optimaalinen lämpötila säilyy kuljetuksen aikana.
2. Vastaanottaessa kryopullo joko säilytetään välittömästi alle -150 °C:n lämpötilassa solujen eheyden säilyttämiseksi tai edetään vaiheeseen 3, jos tarvitaan välitöntä viljelyä.
3. Välitöntä viljelyä varten sulata injektiopullo nopeasti upottamalla se 37 °C:n vesihauteeseen, jossa on puhdasta vettä ja antimikrobista ainetta, ja sekoittamalla sitä varovasti 40-60 sekunnin ajan, kunnes jäädästä on jäljellä pieni jäämöhkäle.
4. Suorita kaikki seuraavat vaiheet steriileissä olosuhteissa virtaushupussa ja desinfioi kryopullo 70-prosenttisellä etanolilla ennen avaamista.
5. Avaa desinfioitu injektiopullo varovasti ja siirrä solususpensio 15 ml:n sentrifugiputkeen, joka sisältää 8 ml huoneenlämpöistä elatusainetta, varovasti sekoittaen.
6. Sentrifugoi seosta 300 x g:n voimakkuudella 3 minuutin ajan solujen erottamiseksi ja hävitä varovasti supernatantti, joka sisältää jäännöspakastusmediumia.
7. Suspendoidaan solupelletti varovasti uudelleen 10 ml:aan tuoretta elatusainetta. Jos solut ovat tarttuvia, jaa suspensio kahden T25-kolvin kesken; jos kyseessä ovat suspensioviljelmät, siirrä kaikki väliaine yhteen T25-kolviin solujen tehokkaan vuorovaikutuksen ja kasvun edistämiseksi.
8. Noudata vakiintuneita aliviljelyprotokollia solulinjan jatkuvan kasvun ja ylläpidon varmistamiseksi ja luotettavien kokeellisten tulosten varmistamiseksi.

Incubation Atmosphere

37 °C, 5 % CO_2 , kostutettu ilmakehä.

Flask Coating

Ei mitään

Shipping Conditions

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäädessä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

Storage Conditions

Pitkäaikaissäilytystä varten injektiopullot asetetaan höyryfaasissa olevaan nestemäiseen tyypeen noin -150 - -196 °C:een. Säilytys -80 °C:ssa on hyväksyttävää vain lyhyenä välivaiheena ennen siirtoa nestemäiseen tyypeen.

Laadunvalvonta / Geneettinen profiili / HLA

PLAT-E-solut | 305855

Sterility

Mykoplasmakontaminaatio suljetaan pois sekä PCR-pohjaisilla määrityksillä että luminesenssiin perustuvilla mykoplasman osoitusmenetelmillä.

Bakteeri-, sieni- tai hiivakontaminaation välttämiseksi soluviljelmät tarkastetaan päivittäin silmämääräisesti.