

PLAT-E sejtek | 305855

Általános információk

Description

A Plat-E (Platinum-E) egy retrovírus-csomagoló sejtvonala, amelyet emberi embrionális vese 293T sejtekből alakítottak ki. Fejlesztésének célja egy stabil és hatékony rendszer biztosítása volt a magas titerű, ekotróp retrovírusok átmeneti előállításához. A sejtvonala olyan újszerű csomagoló konstrukciók felhasználásával hozták létre, amelyekben a vírus szerkezeti génjeinek – gag-pol és env – expresszióját a humán EF1α promóter vezérli, amely a 293T sejtekben lényegesen hatékonyabb, mint a hagyományos MuLV hosszú terminális ismétlődés (LTR) promóter. Ez a kialakítás biztosítja a robusztus transzkripció aktivitást, és támogatja a hatékony retrovírus-összeszereléshez és -csomagoláshoz szükséges víruskomponensek magas szintű előállítását.

A Plat-E sejteket a pEnv-IRES-puro és a pGag-pol-IRES-bsr konstrukciók egymást követő, stabil transzfekciójával állítottuk elő, amelyek a vírúsgéneket belső riboszómabehatolási helyek (IRES) segítségével kapcsolják össze az antibiotikum-rezisztencia markerekkel. Ez a konfiguráció garantálja, hogy csak azok a sejtek szerezzenek antibiotikum-rezisztenciát, amelyek a nélkülözhetetlen vírúsgéneket expresszálják, lehetővé téve a magas expressziójú szubklónok szelekcióját. Az így kapott Plat-E vonal puromicin és blasticidin kettős szelekciója mellett tenyésztve legalább négy hónapig következetesen termel retrovírusokat, amelyek titerje milliliterenként akár 1×10^7 fertőző egység is lehet. Northern blot, reverz transzkriptáz aktivitás és áramlási citometriai elemzések megerősítették, hogy a Plat-E szignifikánsan magasabb gag-pol és env expressziót mutat, mint az előd csomagoló vonalak, például a Bosc23 és a Phoenix-E.

A Plat-E felépítése minimalizálja a replikációra képes retrovírus (RCR) keletkezésének kockázatát azáltal, hogy a csomagoló konstrukciókat a vírus szerkezeti gének szükséges kódoló régióira korlátozza, és azokat különböző plazmidokra osztja szét. Ez a kialakítás legalább három rekombinációs eseményt igényel az RCR előállításához, ezáltal növelve a biológiai biztonságot. A Plat-E hasznosnak bizonyult génátviteli alkalmazásokban, beleértve az elsődleges sejteket, például a T-sejteket és a hízósejteket hatékony transzdukcióját. Teljesítménye és hosszú távú stabilitása megbízható platformmá teszi a retrovirális vektorok előállításához mind az alap kutatásban, mind a preklinikai génterápiás fejlesztésben.

Organism Emberi

Tissue Magzati vese

Synonyms Platinum-E

Jellemzők

Age Magzat

Gender Női

Growth properties Adherent

PLAT-E sejtek | 305855

Szabályozási adatok

Citation	PLAT-E (Cytion katalógusszám: 305855)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_B488
GMO Status	GMO-S1: Ez a retrovirális csomagoló sejtvonallal (PLAT-E) olyan konstrukciókat tartalmaz, amelyek az EF1 α promóter szabályozása alatt kódolják a gag-pol és az env géneket, lehetővé téve az ekotróp retrovirális részecskék előállítását. A módosítások stabilan jelen vannak a HEK293T-ből származó sejtekben. Ez a besorolás kizárólag Németország területén érvényes, más országokban eltérő lehet.

Biomolekuláris adatok

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

A kezelése

Culture Medium	RPMI 1640, w: 2,0 mM stabil glutamin, w: 2,0 g/L NaHCO ₃ (Cytion 820700a cikkszám)
Supplements	A táptalajt egészítsük ki 10% FBS-szel
Dissociation Reagent	Accutase
Seeding density	1–4 × 10 ⁴ sejt/cm ²
Fluid renewal	hetente 2-3 alkalommal
Freeze medium	Krioprezerváló táptalajként teljes növekedési táptalajt (beleértve az FBS-t) + 10% DMSO-t használunk a megfelelő kioltás utáni életképesség érdekében, vagy CM-1-et (Cytion katalógusszám: 800100), amely optimalizált ozmoprotektánsokat és metabolikus stabilizátorokat tartalmaz a regenerálódás fokozása és a krio-indukált stressz csökkentése érdekében.

PLAT-E sejtek | 305855

**Thawing and
Culturing Cells**

1. Ellenőrizze, hogy az injekciós üveg a szállításkor mélyhűtött marad-e, mivel a sejteket szárazjégen szállítják, hogy a szállítás során az optimális hőmérsékletet fenntartsák.
2. Átvételt követően vagy azonnal tárolja a krioampullát $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ alatti hőmérsékleten a sejtek integritásának megőrzése érdekében, vagy folytassa a 3. lépéssel, ha azonnali tenyésztésre van szükség.
3. Azonnali tenyésztés esetén gyorsan fel kell olvasztani az injekciós üveget úgy, hogy tiszta vízzel és antimikrobiális szerrel ellátott $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőbe merítjük, és 40-60 másodpercig óvatosan kevergetjük, amíg egy kis jégcsomó nem marad.
4. Az összes további lépést steril körülmények között, áramlásos elszívóban végezzük el, és nyitás előtt fertőtlenítsük a krioüklét 70%-os etanollal.
5. Óvatosan nyissa fel a fertőtlenített fiolát, és a sejtuszpenziót óvatosan összekeverve helyezze át egy 15 ml-es centrifugacsőbe, amely 8 ml szobahőmérsékletű táptalajt tartalmaz.
6. Centrifugáljuk az elegyet $300 \times g$ -n 3 percig a sejtek szétválasztásához, és óvatosan dobjuk el a maradék fagyasztóközeget tartalmazó felülúszót.
7. Óvatosan szuszpendáljuk újra a sejt pelletet 10 ml friss táptalajban. Adhezív sejtek esetében ossza a szuszpenziót két T25-ös tenyésztőlombik között; szuszpenziós kultúrák esetében az összes tápfolyadékot tegye át egy T25-ös lombikba a hatékony sejtkölcsönhatás és növekedés elősegítése érdekében.
8. A sejt vonal folyamatos növekedése és fenntartása érdekében tartsa be a megállapított szubkultúra protokollokat, biztosítva a megbízható kísérleti eredményeket.

**Incubation
Atmosphere**

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , párasított légkör.

Flask Coating

Nincs

**Shipping
Conditions**

A kriokonzervált sejt vonalakat szárazjégen, validált, szigetelt csomagolásban szállítják, elegendő hűtőközeggel, hogy a szállítás során a hőmérsékletet körülbelül $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartsák. Átvételkor azonnal vizsgálja meg a tárolóedényt, és haladéktalanul helyezze át az injekciós üvegeket a megfelelő tárolóhelyre.

**Storage
Conditions**

Hosszú távú tartósítás céljából helyezze az üvegeket gőzfázisú folyékony nitrogénbe, körülbelül -150 és $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérsékleten. A $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő tárolás csak rövid átmeneti lépésként fogadható el a folyékony nitrogénbe való átvitel előtt.

PLAT-E sejtek | 305855

Minőségellenőrzés / Genetikai profil / HLA

Sterility

A mikoplazma-szennyeződést mind a PCR-alapú vizsgálatokkal, mind a lumineszcencia-alapú mikoplazma-kimutatási módszerekkel kizárják.

A bakteriális, gombás vagy élesztőgombás szennyeződés elkerülése érdekében a sejt kultúrákat napi vizuális ellenőrzésnek vetik alá.