

Cellule PLAT-E | 305855

Informazioni generali

Description

Plat-E (Platinum-E) è una linea cellulare di impacchettamento retrovirale ottenuta a partire dalla linea cellulare renale embrionale umana 293T. È stata sviluppata per fornire un sistema stabile ed efficiente per la produzione transitoria di retrovirus ecotropici ad alto titolo. La linea cellulare è stata costruita utilizzando nuovi costrutti di impacchettamento in cui l'espressione dei geni strutturali virali - gag-pol ed env - è guidata dal promotore EF1 α umano, che è sostanzialmente più potente nelle cellule 293T rispetto al promotore convenzionale a ripetizione terminale lunga (LTR) del MuLV. Questo design garantisce una robusta attività trascrizionale e supporta la produzione ad alto livello dei componenti virali necessari per l'efficiente assemblaggio e impacchettamento del retrovirus.

Le cellule Plat-E sono state generate tramite trasfezione stabile sequenziale dei costrutti pEnv-IRES-puro e pGag-pol-IRES-bsr, che collegano i geni virali a marcatori di resistenza agli antibiotici tramite siti interni di ingresso nel ribosoma (IRES). Questa configurazione garantisce che solo le cellule che esprimono i geni virali essenziali acquisiscano anche la resistenza agli antibiotici, consentendo la selezione di sottocloni ad alta espressione. La linea Plat-E risultante produce costantemente retrovirus con titoli fino a 1×10^7 unità infettive per millilitro per almeno quattro mesi quando coltivata in doppia selezione con puomicina e blasticidina. Analisi Northern blot, dell'attività della trascrittasi inversa e di citometria a flusso hanno confermato che Plat-E mostra un'espressione di gag-pol ed env significativamente più elevata rispetto alle linee di confezionamento precedenti, come Bosc23 e Phoenix-E.

L'architettura di Plat-E riduce al minimo il rischio di generare retrovirus a capacità di replicazione (RCR) limitando i costrutti di packaging alle sole regioni codificanti necessarie dei geni strutturali virali e separandoli su plasmidi diversi. Questo design richiede almeno tre eventi di ricombinazione per produrre RCR, migliorando così la biosicurezza. Plat-E si è dimostrato utile nelle applicazioni di trasferimento genico, compresa l'efficiente trasduzione di cellule primarie come i linfociti T e i mastociti. Le sue prestazioni e la sua stabilità a lungo termine lo rendono una piattaforma affidabile per la produzione di vettori retrovirali sia nella ricerca di base che nello sviluppo preclinico della terapia genica.

Organism Umano

Tissue Rene fetale

Synonyms Platinum-E

Caratteristiche

Age Feto

Gender Donna

Growth properties Aderente

Dati normativi

Cellule PLAT-E | 305855

Citation	PLAT-E (codice catalogo Cytion 305855)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_B488
GMO Status	GMO-S1: Questa linea cellulare per l'impacchettamento retrovirale (PLAT-E) contiene costrutti che codificano per gag-pol ed env sotto il controllo del promotore EF1 α , consentendo la produzione di particelle retrovirali ecotrope. Le modificazioni sono presenti in modo stabile nelle cellule derivate da HEK293T. Questa classificazione è valida solo in Germania e potrebbe differire altrove.

Dati biomolecolari

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

Manipolazione

Culture Medium	RPMI 1640, w: 2,0 mM di glutammina stabile, w: 2,0 g/L di NaHCO ₃ (articolo Cytion numero 820700a)
Supplements	Integrare il terreno di coltura con il 10% di FBS
Dissociation Reagent	Accutase
Seeding density	da 1 a 4 × 10 ⁴ cellule/cm ²
Fluid renewal	da 2 a 3 volte alla settimana
Freeze medium	Come terreno di crioconservazione, utilizziamo un terreno di crescita completo (incluso FBS) + 10% DMSO per un'adeguata vitalità post-scongelo, o CM-1 (numero di catalogo Cytion 800100), che include osmoprotettori e stabilizzatori metabolici ottimizzati per migliorare il recupero e ridurre lo stress crio-indotto.

Cellule PLAT-E | 305855

Thawing and Culturing Cells

1. Verificare che la fiala rimanga profondamente congelata al momento della consegna, poiché le cellule vengono spedite con ghiaccio secco per mantenere le temperature ottimali durante il trasporto.
2. Al ricevimento, conservare immediatamente la criovial a temperature inferiori a -150°C per garantire la conservazione dell'integrità cellulare, oppure procedere al punto 3 se è necessaria una coltura immediata.
3. Per la coltura immediata, scongelare rapidamente la fiala immergendola in un bagno d'acqua a 37°C con acqua pulita e un agente antimicrobico, agitando delicatamente per 40-60 secondi finché non rimane un piccolo grumo di ghiaccio.
4. Eseguire tutte le fasi successive in condizioni di sterilità in una cappa a flusso, disinfettando la criovial con etanolo al 70% prima dell'apertura.
5. Aprire con cautela la fiala disinfettata e trasferire la sospensione cellulare in una provetta da centrifuga da 15 ml contenente 8 ml di terreno di coltura a temperatura ambiente, mescolando delicatamente.
6. Centrifugare la miscela a 300 x g per 3 minuti per separare le cellule e scartare con cura il surnatante contenente il terreno di coltura residuo.
7. Risospendere delicatamente il pellet cellulare in 10 ml di terreno di coltura fresco. Per le cellule aderenti, dividere la sospensione tra due fiasche di coltura T25; per le colture in sospensione, trasferire tutto il terreno in una fiasca T25 per promuovere l'interazione e la crescita delle cellule.
8. Attenersi ai protocolli di subcoltura stabiliti per la crescita e il mantenimento continui della linea cellulare, garantendo risultati sperimentali affidabili.

Incubation Atmosphere

37°C, 5% CO₂, atmosfera umidificata.

Flask Coating

Nessuno

Shipping Conditions

Le linee cellulari crioconservate vengono spedite su ghiaccio secco in confezioni isolate e convalidate, con una quantità di refrigerante sufficiente a mantenere circa -78 °C durante il trasporto. Al ricevimento, ispezionare immediatamente il contenitore e trasferire immediatamente le fiale in un luogo di conservazione appropriato.

Storage Conditions

Per la conservazione a lungo termine, porre le fiale in azoto liquido in fase vapore a una temperatura compresa tra -150 e -196 °C circa. La conservazione a -80 °C è accettabile solo come breve fase intermedia prima del trasferimento in azoto liquido.

Cellule PLAT-E | 305855

Controllo di qualità / Profilo genetico / HLA

Sterility

La contaminazione da micoplasma viene esclusa utilizzando sia saggi basati sulla PCR sia metodi di rilevamento del micoplasma basati sulla luminescenza.

Per garantire l'assenza di contaminazione batterica, fungina o da lieviti, le colture cellulari sono sottoposte a ispezioni visive quotidiane.