

PLAT-E ląstelės | 305855

Bendra informacija

Description

„Plat-E“ (Platinum-E) – tai retrovirusų pakavimo ląstelių linija, sukurta remiantis žmogaus embrioninių inkstų 293T ląstelių pagrindu. Ji buvo sukurta siekiant užtikrinti stabilią ir veiksmingą sistemą, skirtą didelio titro ekotropinių retrovirusų laikiniam gamybai. Ląstelių linija buvo sukurta naudojant naujus pakavimo konstruktus, kuriuose virusinių struktūrinių genų – gag-pol ir env – ekspresiją skatina žmogaus EF1α promotorius, kuris 293T ląstelėse yra žymiai galingesnis nei įprastas MuLV ilgojo terminalo pakartojimo (LTR) promotorius. Ši konstrukcija užtikrina tvirtą transkripcinę veiklą ir palaiko aukšto lygio virusinių komponentų, būtinų efektyviam retrovirusų surinkimui ir pakavimui, gamybą.

Plat-E ląstelės buvo sukurtos nuosekliai stabiliai transfekuojant pEnv-IRES-puro ir pGag-pol-IRES-bsr konstrukcijas, kurios per vidinius ribosomų įėjimo taškus (IRES) susieja virusinius genus su antibiotikų atsparumo žymekliais. Ši konfigūracija garantuoja, kad tik ląstelės, ekspresuojančios esminius virusinius genus, taip pat įgyja atsparumą antibiotikams, leidžiant atrinkti subklonus, pasižyminčius didele ekspresija. Gauta Plat-E linija nuosekliai gamina retrovirusus, kurių titras siekia iki 1×10^7 infekcinių vienetų mililitre bent keturis mėnesius, kai kultivuojama dvigubo atrankos su puromicinu ir blasticidinu sąlygomis. Northern blot, atvirkštinės transkriptazės aktyvumo ir srauto citometrijos analizės patvirtino, kad Plat-E pasižymi žymiai didesne gag-pol ir env ekspresija nei ankstesnės pakavimo linijos, tokios kaip Bosc23 ir Phoenix-E.

„Plat-E“ struktūra sumažina riziką susidaryti replikacijos kompetentingam retrovirusui (RCR), apribojant pakavimo konstruktus tik būtinomis virusinių struktūrinių genų kodavimo sritimis ir atskiriant jas į skirtingas plazmidas. Šis dizainas reikalauja mažiausiai trijų rekombinacijos įvykių, kad susidarytų RCR, taip padidindamas biologinį saugumą. „Plat-E“ pasirodė esanti naudinga genų perkėlimo taikymuose, įskaitant veiksmingą pirminių ląstelių, pvz., T ląstelių ir putliųjų ląstelių, transdukciją. Jos našumas ir ilgalaikis stabilumas daro ją patikima platforma retrovirusinių vektorių gamybai tiek fundamentiniuose tyrimuose, tiek ikiklinikiniuose genų terapijos kūrimo etapuose.

Organism Žmogus

Tissue Vaisiaus inkstas

Synonyms „Platinum-E“

Charakteristikos

Age Vaisius

Gender Moteris

Growth properties Prigludęs

Reguliavimo duomenys

PLAT-E ląstelės | 305855

Citation	PLAT-E (Cytion katalogo numeris 305855)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_B488
GMO Status	GMO-S1: Ši retrovirusų pakavimo ląstelių linija (PLAT-E) yra modifikuota taip, kad joje esantys genų konstrukty, koduojančių gag-pol ir env baltymus, veikimą reguliuoja EF1 α promotorius, o tai leidžia gaminti ekotropines retrovirusų daleles. Šios modifikacijos yra stabiliai išlaikomos iš HEK293T ląstelių išaugintose ląstelėse. Ši klasifikacija galioja tik Vokietijoje ir kitose šalyse gali skirtis.

Biomolekuliniai duomenys

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

Tvarkymas

Culture Medium	RPMI 1640, š: 2,0 mM stabilus glutaminas, š: 2,0 g/L NaHCO ₃ (Cytion gaminio numeris 820700a)
Supplements	Papildykite terpę 10 % FBS
Dissociation Reagent	Accutase
Seeding density	$1-4 \times 10^4$ ląstelių/cm ²
Fluid renewal	2-3 kartus per savaitę
Freeze medium	Kaip kriokonservavimo terpę naudojame visišką augimo terpę (įskaitant FBS) + 10 % DMSO, kad būtų užtikrintas tinkamas gyvybingumas po atšildymo, arba CM-1 (Cytion katalogo numeris 800100), kurioje yra optimizuotų osmoprotektorių ir medžiagų apykaitos stabilizatorių, kad būtų pagerintas atsigavimas ir sumažintas kriokonservavimo sukeltas stresas.

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

1. Patikrinkite, ar pristatant buteliuką jis išlieka gerai užšaldytas, nes ląstelės gabenamos ant sauso ledo, kad gabenimo metu būtų palaikoma optimali temperatūra.
2. Gavę iš karto laikykite kriovialą žemesnėje nei $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, kad užtikrintumėte ląstelių vientisumo išsaugojimą, arba pereikite prie 3 veiksmo, jei reikia nedelsiant kultivuoti.
3. Jei norite nedelsiant pradėti kultivuoti, greitai atšildykite buteliuką panardindami jį į $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūros vandens vonelę su švariu vandeniu ir antimikrobine priemone, švelniai maišydami 40-60 sekundžių, kol liks nedidelis ledo gabalėlis.
4. Visus tolesnius veiksmus atlikite steriliomis sąlygomis srauto gaubte, prieš atidarydami kriovialą dezinfekuokite jį 70 % etanoliu.
5. Atsargiai atidarykite dezinfekuotą buteliuką ir perpilkite ląstelių suspensiją į 15 ml centrifugos mėgintuvėlį, kuriame yra 8 ml kambario temperatūros mitybinės terpės, atsargiai išmaišykite.
6. Mišinį centrifuguokite 300 x g greičiu 3 minutes, kad atsiskirtų ląstelės, ir atsargiai išmeskite supernatantą su šaldymo terpės likučiais.
7. Švelniai resuspenduokite ląstelių granules 10 ml šviežios mitybinės terpės. Jei ląstelės yra prigludusios, suspensiją padalykite į dvi T25 kolbas; jei tai suspensinės kultūros, visą terpę perkelti į vieną T25 kolbą, kad paskatintumėte veiksmingą ląstelių sąveiką ir augimą.
8. Laikykitės nustatytų subkultūrų protokolų, kad ląstelių linija nuolat augtų ir būtų palaikoma, taip užtikrinant patikimus eksperimentų rezultatus.

**Incubation
Atmosphere**

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , drėkintoje atmosferoje.

Flask Coating

Nėra

**Shipping
Conditions**

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkelti mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

**Storage
Conditions**

Norėdami ilgai saugoti, įdėkite buteliukus į garų fazės skystą azotą maždaug $-150\text{--}196\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Laikymas $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje yra priimtinas tik kaip trumpas tarpinis etapas prieš perkelti į skystąjį azotą.

Kokybės kontrolė / Genetinis profilis / HLA

PLAT-E ląstelės | 305855

Sterility

Mikoplazmos užterštumas atmetamas taikant PGR pagrįstus tyrimus ir liuminescencinius mikoplazmos aptikimo metodus.

Siekiant užtikrinti, kad nebūtų užteršimo bakterijomis, grybeliais ar mielėmis, ląstelių kultūros kasdien vizualiai tikrinamos.