

PLAT-E šūnas | 305855

Vispārīga informācija

Description

Plat-E (Platinum-E) ir retrovīrusu iepakšanas šūnu līnija, kas izveidota, izmantojot cilvēka embrionālo nieru 293T šūnu kā pamatu. Tā tika izstrādāta, lai nodrošinātu stabilu un efektīvu sistēmu augsta titra ekotrofo retrovīrusu pagaidu ražošanai. Šūnu līnija tika izveidota, izmantojot jaunus iepakšanas konstruktus, kuros vīrusu strukturālo gēnu — gag-pol un env — ekspresiju virza cilvēka EF1α promotors, kas 293T šūnās ir ievērojami spēcīgāks nekā parastais MuLV garā terminālā atkārtojuma (LTR) promotors. Šis dizains nodrošina stabilu transkripcijas aktivitāti un atbalsta augsta līmeņa vīrusu komponentu ražošanu, kas nepieciešama efektīvai retrovīrusu montāžai un iepakšanai.

Plat-E šūnas tika iegūtas, secīgi veicot stabilu pEnv-IRES-puror un pGag-pol-IRES-bsr konstrukciju transfekciju, kas saista vīrusu gēnus ar antibiotiku rezistences marķieriem caur iekšējām ribosomu ieejas vietām (IRES). Šī konfigurācija garantē, ka tikai šūnas, kas ekspresē būtiskos vīrusu gēnus, iegūst arī antibiotiku rezistenci, ļaujot atlasīt subklonus ar augstu ekspresiju. Iegūtā Plat-E līnija konsekventi ražo retrovirusus ar titriem līdz 1×10^7 infekciozajām vienībām uz mililitru vismaz četrus mēnešus, ja tiek kultivēta dubultās selekcijas apstākļos ar puromicīnu un blastidīnu. Northern blot, reversās transkriptāzes aktivitātes un plūsmas citometrijas analīzes apstiprināja, ka Plat-E izrāda ievērojami augstāku gag-pol un env ekspresiju nekā iepriekšējās iepakšanas līnijas, piemēram, Bosc23 un Phoenix-E.

Plat-E arhitektūra samazina risku radīt replikācijas spējīgus retrovirusus (RCR), ierobežojot iepakšanas konstrukcijas tikai ar nepieciešamajām vīrusu strukturālo gēnu kodējošajām reģionām un sadalot tās dažādās plazmīdās. Šis dizains prasa vismaz trīs rekombinācijas notikumus, lai radītu RCR, tādējādi uzlabojot bioloģisko drošību. Plat-E ir pierādījis savu lietderību gēnu pārnesei lietojumos, tostarp efektīvā primāro šūnu, piemēram, T šūnu un tūskas šūnu, transdukcijā. Tā veiktspēja un ilgtermiņa stabilitāte padara to par uzticamu platformu retrovirālo vektoru ražošanai gan pamatpētniecībā, gan pirmsklīniskajā gēnu terapijas attīstībā.

Organism Cilvēks

Tissue Augļa nieres

Synonyms Platinum-E

Raksturojums

Age Auglis

Gender Sievietes

Growth properties Adherent

Normatīvie dati

Citation PLAT-E (Cytion kataloga numurs 305855)

PLAT-E šūnas | 305855

Biosafety level 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_B488**GMO Status** GMO-S1: Šī retrovirālo daļiņu iepakojšanas šūnu līnija (PLAT-E) satur konstrukts, kas kodē gag-pol un env gēnus EF1α promotora kontrolē, nodrošinot ekotropo retrovirālo daļiņu ražošanu. Šīs modifikācijas ir stabili klātesošas no HEK293T atvasinātajās šūnās. Šī klasifikācija ir spēkā tikai Vācijā un citās valstīs var atšķirties.**Biomolekulārie dati****Mutational profile****Darbs ar****Culture Medium** RPMI 1640, w: 2,0 mM stabils glutamīns, w: 2,0 g/L NaHCO₃ (Cytion izstrādājuma numurs 820700a)**Supplements** Papildināt barotni ar 10% FBS**Dissociation Reagent** Accutase**Seeding density** 1 līdz 4×10^4 šūnas/cm²**Fluid renewal** 2 līdz 3 reizes nedēļā**Freeze medium** Kā kriokonservēšanas barotni mēs izmantojam pilnvērtīgu augšanas barotni (ieskaitot FBS) + 10 % DMSO, lai nodrošinātu pietiekamu dzīvotspēju pēc atkausēšanas, vai CM-1 (Cytion kataloga numurs 800100), kas ietver optimizētus osmoprotektorus un metaboliskos stabilizatorus, lai uzlabotu atveseļošanu un samazinātu krioinducēto stresu.

PLAT-E šūnas | 305855

**Thawing and
Culturing Cells**

1. Pārliecinieties, ka pēc piegādes flakons paliek dziļi sasaldēts, jo šūnas tiek sūtītas uz sausā ledus, lai pārvadāšanas laikā saglabātu optimālu temperatūru.
2. Pēc saņemšanas vai nu nekavējoties uzglabāt kriovialu temperatūrā, kas zemāka par -150 °C, lai nodrošinātu šūnu integritātes saglabāšanu, vai arī turpināt 3. posmu, ja nepieciešama tūlītēja kultivēšana.
3. Tūlītējas kultivēšanas gadījumā ātri atkausējiet flakonu, iegremdējot to 37°C ūdens vannā ar tīru ūdeni un antibakteriālu līdzekli, viegli maisot 40-60 sekundes, līdz paliek neliels ledus gabaliņš.
4. Visas turpmākās darbības veiciet sterilos apstākļos plūsmas nosūcējā, pirms atvēršanas dezinficējot kriovialu ar 70% etanolu.
5. Uzmanīgi atveriet dezinficēto flakonu un pārnesiet šūnu suspensiju 15 ml centrifūgas mēģenē, kurā ir 8 ml istabas temperatūras barotnes, uzmanīgi samaisot.
6. Centrifugējiet maisījumu ar 300 x g 3 minūtes, lai atdalītu šūnas, un uzmanīgi izmetiet virskārtu, kas satur saldēšanas barotnes atlikumus.
7. Viegli resuspendēt šūnu granulas 10 ml svaigas barotnes. Adhēzijas šūnu gadījumā suspensiju sadalīt divās T25 kolbās; suspensijas kultūrām visu barotni pārnest vienā T25 kolbā, lai veicinātu efektīvu šūnu mijiedarbību un augšanu.
8. Ievērojiet noteiktos subkultūru protokolus, lai nodrošinātu nepārtrauktu šūnu līnijas augšanu un uzturēšanu, tādējādi nodrošinot uzticamus eksperimentu rezultātus.

**Incubation
Atmosphere**

37°C, 5% CO_2 , mitrināta atmosfēra.

Flask Coating

Neviens

**Shipping
Conditions**

Kriokonservētas šūnu līnijas tiek sūtītas uz sausā ledus apstiprinātā, izolētā iepakojumā ar pietiekamu dzesēšanas šķidrums daudzumu, lai visā transportēšanas laikā uzturētu aptuveni -78 °C temperatūru. Pēc saņemšanas nekavējoties pārbaudiet iepakojumu un nekavējoties pārvietojiet flakonus uz atbilstošu uzglabāšanas vietu.

**Storage
Conditions**

Ilgstošai uzglabāšanai flakonus ievietojiet šķidrā slāpekļī ar tvaika fāzi aptuveni -150 līdz -196 °C temperatūrā. Uzglabāšana -80 °C temperatūrā ir pieļaujama tikai kā īss starposms pirms pārvietošanas uz šķidro slāpekli.

PLAT-E šūnas | 305855

Kvalitātes kontrole / Ģenētiskais profils / HLA

Sterility

Mikoplazmas piesārņojums tiek izslēgts, izmantojot gan uz PCR balstītus testus, gan uz luminiscenci balstītas mikoplazmas noteikšanas metodes.

Lai pārliecinātos, ka nav baktēriju, sēnīšu vai rauga piesārņojuma, šūnu kultūras katru dienu vizuāli pārbauda.