

PLAT-E-cellen | 305855

Algemene informatie

Description

Plat-E (Platinum-E) is een retrovirus-verpakkingscellijn die is ontwikkeld op basis van de menselijke embryonale niercel 293T. Deze cellijn is ontwikkeld om een stabiel en efficiënt systeem te bieden voor de tijdelijke productie van ecotrope retrovirussen met een hoge titer. De cellijn is geconstrueerd met behulp van nieuwe verpakkingsconstructen waarin de expressie van virale structurele genen – gag-pol en env – wordt aangestuurd door de menselijke EF1 α -promotor, die in 293T-cellen aanzienlijk krachtiger is dan de conventionele MuLV long terminal repeat (LTR)-promotor. Dit ontwerp zorgt voor een robuuste transcriptieactiviteit en ondersteunt de productie op hoog niveau van virale componenten die nodig zijn voor een efficiënte assemblage en verpakking van retrovirussen.

Plat-E-cellen werden gegenereerd door middel van opeenvolgende stabiele transfectie van pEnv-IRES-puro- en pGag-pol-IRES-*bsr*-constructen, die de virale genen via interne ribosoom-toegangsplaatsen (IRES) koppelen aan antibiotica-resistentiemarkers. Deze configuratie garandeert dat alleen cellen die de essentiële virale genen tot expressie brengen ook antibioticaresistentie verwerven, waardoor selectie van subklonen met hoge expressie mogelijk is. De resulterende Plat-E-lijn produceert consistent retrovirussen met titers tot 1×10^7 infectieuze eenheden per milliliter gedurende ten minste vier maanden bij kweek onder dubbele selectie met puromycine en blasticidine. Northern-blot-, reverse-transcriptase-activiteits- en flowcytometrieanalyses bevestigden dat Plat-E een significant hogere gag-pol- en env-expressie vertoont dan eerdere verpakkingslijnen zoals Bosc23 en Phoenix-E.

De architectuur van Plat-E minimaliseert het risico op het genereren van replicatiecompetente retrovirussen (RCR) door de verpakkingsconstructen te beperken tot alleen de noodzakelijke coderende regio's van de virale structuurgenen en deze te scheiden op verschillende plasmiden. Dit ontwerp vereist ten minste drie recombinatie-events om RCR te produceren, waardoor de bioveiligheid wordt verbeterd. Plat-E is nuttig gebleken bij genoverdrachtstoepassingen, waaronder efficiënte transductie van primaire cellen zoals T-cellen en mestcellen. De prestaties en langetermijnstabiliteit maken het een betrouwbaar platform voor de productie van retrovirale vectoren in zowel fundamenteel onderzoek als de preklinische ontwikkeling van getherapie.

Organism Mens

Tissue Foetale nier

Synonyms Platinum-E

Kenmerken

Age Foetus

Gender Vrouw

Growth properties Aanhangend

Regelgevende gegevens

PLAT-E-cellen | 305855

Citation	PLAT-E (Cytion-catalogusnummer 305855)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_B488
GMO Status	GMO-S1: Deze retrovirale verpakkingscellijn (PLAT-E) bevat constructen die coderen voor gag-pol en env onder controle van de EF1 α -promotor, waardoor de productie van ecotrope retrovirale deeltjes mogelijk wordt. De modificaties zijn stabiel aanwezig in van HEK293T afgeleide cellen. Deze classificatie geldt alleen binnen Duitsland en kan elders afwijken.

Biomoleculaire gegevens

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

Omgaan met

Culture Medium	RPMI 1640, w: 2,0 mM stabiele Glutamine, w: 2,0 g/L NaHCO ₃ (Cytion artikelnummer 820700a)
Supplements	Vul het medium aan met 10% FBS
Dissociation Reagent	Accutase
Seeding density	1 tot 4×10^4 c ^{ellen} /cm ²
Fluid renewal	2 tot 3 keer per week
Freeze medium	Als cryoconserveringsmedium gebruiken we volledig groeimedum (inclusief FBS) + 10% DMSO voor voldoende levensvatbaarheid na het ontdooien, of CM-1 (Cytion catalogusnummer 800100), dat geoptimaliseerde osmoprotectanten en metabolische stabilisatoren bevat om het herstel te verbeteren en door cryo geïnduceerde stress te verminderen.

PLAT-E-cellen | 305855

Thawing and Culturing Cells

1. Controleer of de flacon bij levering diepgevroren blijft, aangezien de cellen op droog ijs worden verzonden om optimale temperaturen tijdens het transport te behouden.
2. Bewaar het cryoflesje na ontvangst onmiddellijk bij temperaturen lager dan $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ om de integriteit van de cellen te behouden, of ga verder met stap 3 als onmiddellijke kweek vereist is.
3. Voor onmiddellijke kweek: ontdooi de flacon snel door deze onder te dompelen in een waterbad van $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ met schoon water en een antimicrobieel middel, waarbij u 40-60 seconden zachtjes schudt totdat er een klein ijsklontje overblijft.
4. Voer alle volgende stappen uit onder steriele omstandigheden in een stromingskap en desinfecteer de cryoflacon met 70% ethanol voordat deze wordt geopend.
5. Open voorzichtig de gedesinfecteerde flacon en breng de celsuspensie over in een centrifugebuis van 15 ml met 8 ml kweekmedium op kamertemperatuur en meng voorzichtig.
6. Centrifugeer het mengsel gedurende 3 minuten bij $300 \times g$ om de cellen te scheiden en gooi het supernatant met resterend vriesmedium voorzichtig weg.
7. Resuspendeer de celpellet voorzichtig in 10 ml vers kweekmedium. Verdeel voor adherente cellen de suspensie over twee T25-kweekkolven; breng voor suspensiekweken al het medium over in één T25-kweekkolf om effectieve celinteractie en -groei te bevorderen.
8. Houd u aan de vastgestelde subcultuurprotocollen voor continue groei en onderhoud van de cellijn, om betrouwbare experimentele resultaten te garanderen.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , bevochtigde atmosfeer.

Flask Coating

Geen

Shipping Conditions

Gecryopreserveerde cellijnen worden verzonden op droog ijs in gevalideerde, geïsoleerde verpakkingen met voldoende koelmiddel om gedurende het transport ongeveer $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ te handhaven. Inspecteer de verpakking onmiddellijk na ontvangst en breng de flacons onverwijld over naar de juiste opslagplaats.

Storage Conditions

Voor langdurige bewaring plaatst u flesjes in vloeibare stikstof in dampfase bij ongeveer -150 tot $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Opslag bij $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ is alleen aanvaardbaar als korte tussenstap vóór overbrenging naar vloeibare stikstof.

Kwaliteitscontrole / Genetisch profiel / HLA

PLAT-E-cellen | 305855

Sterility

Mycoplasma-verontreiniging wordt uitgesloten met zowel PCR-gebaseerde testen als op luminescentie gebaseerde mycoplasma-detectiemethoden.

Om er zeker van te zijn dat er geen besmetting is met bacteriën, schimmels of gisten, worden de celculturen dagelijks onderworpen aan visuele inspecties.