

Komórki PLAT-E | 305855

Informacje ogólne

Description

Plat-E (Platinum-E) to linia komórkowa służąca do pakowania retrowirusów, wyhodowana na bazie ludzkich embrionalnych komórek nerkowych 293T. Została ona opracowana w celu zapewnienia stabilnego i wydajnego systemu do przejściowej produkcji ekotropowych retrowirusów o wysokim mianie. Linia komórkowa została skonstruowana przy użyciu nowatorskich konstrukcji pakujących, w których ekspresja genów strukturalnych wirusa – gag-pol i env – jest sterowana przez ludzki promotor EF1 α , który jest znacznie silniejszy w komórkach 293T niż konwencjonalny promotor długiego powtórzenia terminalnego (LTR) wirusa MuLV. Taka konstrukcja zapewnia silną aktywność transkrypcyjną i umożliwia produkcję na wysokim poziomie składników wirusowych niezbędnych do wydajnego montażu i pakowania retrowirusów.

Komórki Plat-E wyhodowano poprzez sekwencyjną stabilną transfekcję konstrukcji pEnv-IRES-puro i pGag-pol-IRES-bsr, które łączą geny wirusowe z markerami oporności na antybiotyki poprzez wewnętrzne miejsca wejścia rybosomu (IRES). Taka konfiguracja gwarantuje, że tylko komórki wyrażające niezbędne geny wirusowe zyskują również oporność na antybiotyki, co pozwala na selekcję subklonów o wysokiej ekspresji. Powstała linia Plat-E konsekwentnie wytwarza retrowirusy o mianie do 1×10^7 jednostek zakaźnych na mililitr przez co najmniej cztery miesiące, gdy jest hodowana w warunkach podwójnej selekcji z użyciem puromycyny i blastycydyny. Analizy metodą Northern blot, aktywności odwrotnej transkryptazy oraz cytometrii przepływowej potwierdziły, że Plat-E wykazuje znacznie wyższą ekspresję gag-pol i env niż poprzednie linie pakujące, takie jak Bosc23 i Phoenix-E.

Architektura Plat-E minimalizuje ryzyko wytworzenia retrowirusa zdolnego do replikacji (RCR) poprzez ograniczenie konstrukcji pakujących wyłącznie do niezbędnych regionów kodujących genów strukturalnych wirusa i rozdzielenie ich na różne plazmidy. Taka konstrukcja wymaga co najmniej trzech zdarzeń rekombinacji do wytworzenia RCR, co zwiększa bezpieczeństwo biologiczne. Plat-E okazał się przydatny w zastosowaniach związanych z transferem genów, w tym w skutecznej transdukcji komórek pierwotnych, takich jak komórki T i komórki tuczne. Jego wydajność i długoterminowa stabilność sprawiają, że jest to niezawodna platforma do produkcji wektorów retrowirusowych zarówno w badaniach podstawowych, jak i przedklinicznym rozwoju terapii genowej.

Organism Człowiek

Tissue Nerka płodu

Synonyms Platinum-E

Charakterystyka

Age Płód

Gender Kobieta

Growth properties Adherent

Komórki PLAT-E | 305855

Dane regulacyjne

Citation	PLAT-E (numer katalogowy Cytion 305855)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_B488
GMO Status	GMO-S1: Ta linia komórkowa służąca do pakowania retrowirusów (PLAT-E) zawiera konstrukcje kodujące geny gag-pol i env pod kontrolą promotora EF1 α , co umożliwia produkcję cząstek retrowirusów ekotropowych. Modyfikacje te są stabilnie obecne w komórkach pochodzących z linii HEK293T. Klasyfikacja ta obowiązuje wyłącznie na terenie Niemiec i może różnić się w innych krajach.

Dane biomolekularne

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

Obsługa

Culture Medium	RPMI 1640, w: 2,0 mM stabilnej glutaminy, w: 2,0 g/L NaHCO ₃ (numer artykułu Cytion 820700a)
Supplements	Uzupełnić podłoże 10% FBS
Dissociation Reagent	Accutase
Seeding density	od 1 do 4 × 10 ⁴ komórek/cm ²
Fluid renewal	2 do 3 razy w tygodniu
Freeze medium	Jako pożywki do kriokonserwacji używamy kompletnej pożywki wzrostowej (w tym FBS) + 10% DMSO w celu zapewnienia odpowiedniej żywotności po rozmrożeniu lub CM-1 (numer katalogowy Cytion 800100), która zawiera zoptymalizowane osmoprotektanty i stabilizatory metaboliczne w celu zwiększenia regeneracji i zmniejszenia stresu wywołanego kriokonserwacją.

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

1. Upewnij się, że fiolka pozostaje głęboko zamrożona w momencie dostawy, ponieważ komórki są wysyłane w suchym lodzie, aby utrzymać optymalną temperaturę podczas transportu.
2. Po otrzymaniu należy natychmiast przechowywać fiolkę w temperaturze poniżej -150°C , aby zapewnić zachowanie integralności komórek, lub przejść do kroku 3, jeśli wymagana jest natychmiastowa hodowla.
3. W przypadku natychmiastowej hodowli należy szybko rozmrozić fiolkę, zanurzając ją w łaźni wodnej o temperaturze 37°C z czystą wodą i środkiem przeciwdrobnoustrojowym, delikatnie mieszając przez 40-60 sekund, aż pozostanie niewielka grudka lodu.
4. Wykonaj wszystkie kolejne kroki w sterylnych warunkach w kapturze przepływowej, dezynfekując fiolkę 70% etanolem przed otwarciem.
5. Ostrożnie otworzyć zdezynfekowaną fiolkę i przenieść zawiesinę komórek do 15 ml probówki wirówkowej zawierającej 8 ml podłoża hodowlanego o temperaturze pokojowej, delikatnie mieszając.
6. Wirować mieszaninę z prędkością $300 \times g$ przez 3 minuty w celu oddzielenia komórek i ostrożnie odrzucić supernatant zawierający pozostałości pożywki do zamrażania.
7. Delikatnie ponownie zawiesić osad komórek w 10 ml świeżego podłoża hodowlanego. W przypadku komórek przylegających, rozdzielić zawiesinę pomiędzy dwie kolby hodowlane T25; w przypadku hodowli zawieszonych, przenieść całą pożywkę do jednej kolby T25 w celu promowania skutecznej interakcji i wzrostu komórek.
8. Przestrzegaj ustalonych protokołów podhodowli w celu ciągłego wzrostu i utrzymania linii komórkowej, zapewniając wiarygodne wyniki eksperymentów.

**Incubation
Atmosphere**

37°C , 5% CO_2 , nawilżona atmosfera.

Flask Coating

Brak

**Shipping
Conditions**

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiolki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

Komórki PLAT-E | 305855

Storage Conditions

W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiołki w ciekłym azocie w fazie lotnej w temperaturze od -150 do -196 °C. Przechowywanie w temperaturze -80 °C jest dopuszczalne tylko jako krótki etap przejściowy przed przeniesieniem do ciekłego azotu.

Kontrola jakości / Profil genetyczny / HLA

Sterility

Zanieczyszczenie mykoplazmą jest wykluczane przy użyciu zarówno testów opartych na PCR, jak i metod wykrywania mykoplazmy opartych na luminescencji.

Aby upewnić się, że nie ma zanieczyszczenia bakteriami, grzybami lub drożdżami, hodowle komórkowe są poddawane codziennym kontrolom wizualnym.