

## PLAT-E bunky | 305855

## Všeobecné informácie

## Description

Plat-E (Platinum-E) je bunková línia určená na balenie retrovírusov, vytvorená na základe ľudských embryonálnych obličkových buniek 293T. Bola vyvinutá s cieľom poskytnúť stabilný a efektívny systém na dočasnú produkciu ekotrofných retrovírusov s vysokým titrom. Bunka bola vytvorená pomocou nových baliacich konštruktov, v ktorých je expresia vírusových štruktúrnych génov – gag-pol a env – riadená ľudským promotérom EF1 $\alpha$ , ktorý je v bunkách 293T podstatne silnejší ako bežný promotér MuLV s dlhým terminálnym opakovaním (LTR). Táto konštrukcia zabezpečuje silnú transkripčnú aktivitu a podporuje vysokú produkciu vírusových zložiek potrebných na efektívne zostavenie a balenie retrovírusov.

Bunky Plat-E boli generované prostredníctvom postupnej stabilnej transfekcie konštruktov pEnv-IRES-puro a pGag-pol-IRES-bsr, ktoré spájajú vírusové gény s markermi rezistencie voči antibiotikám prostredníctvom vnútorných miest vstupu do ribozómu (IRES). Táto konfigurácia zaručuje, že iba bunky exprimujúce esenciálne vírusové gény získajú aj rezistenciu voči antibiotikám, čo umožňuje selekciu subklonov s vysokou expresiou. Výsledná línia Plat-E konzistentne produkuje retrovírusy s titrami až  $1 \times 10^7$  infekčných jednotiek na mililiter po dobu najmenej štyroch mesiacov pri kultivácii v podmienkach dvojitej selekcie s puromycínom a blastocidínom. Analýzy Northern blot, aktivity reverznej transkriptázy a prietokovej cytometrie potvrdili, že Plat-E vykazuje výrazne vyššiu expresiu gag-pol a env ako predchádzajúce baliace línie, ako sú Bosc23 a Phoenix-E.

Architektúra Plat-E minimalizuje riziko generovania replikačne kompetentného retrovírusu (RCR) tým, že obmedzuje baliace konštrukty iba na potrebné kódujúce oblasti vírusových štruktúrnych génov a oddeluje ich na rôzne plazmidy. Tento dizajn vyžaduje najmenej tri rekombinačné udalosti na produkciu RCR, čím sa zvyšuje biologická bezpečnosť. Plat-E sa osvedčil v aplikáciách génového prenosu, vrátane efektívnej transdukcie primárnych buniek, ako sú T bunky a žirné bunky. Jeho výkonnosť a dlhodobá stabilita z neho robia spoľahlivú platformu pre produkciu retrovírových vektorov v základnom výskume aj v predklinickom vývoji génovej terapie.

**Organism**      Ľudské

**Tissue**            Plodová oblička

**Synonyms**        Platinum-E

## Charakteristika

**Age**                Plod

**Gender**            Ženy

**Growth properties**      Adherent

## Regulačné údaje

## PLAT-E bunky | 305855

<b>Citation</b>	PLAT-E (katalógové číslo Cytion 305855)
<b>Biosafety level</b>	1
<b>NCBI_TaxID</b>	9606
<b>CellosaurusAccession</b>	CVCL_B488
<b>GMO Status</b>	GMO-S1: Táto retrovirová baliaca bunková línia (PLAT-E) obsahuje konštrukty kódujúce gény gag-pol a env pod kontrolou promotora EF1 $\alpha$ , čo umožňuje produkciu ekotropných retrovirových častíc. Tieto modifikácie sú stabilne prítomné v bunkách odvodených z HEK293T. Toto zaradenie platí iba v Nemecku a v iných krajinách sa môže líšiť.

## Biomolekulárne údaje

<b>Mutational profile</b>	
---------------------------	--

## Spracovanie

<b>Culture Medium</b>	RPMI 1640, w: 2,0 mM stabilný glutamín, w: 2,0 g/L NaHCO <sub>3</sub> (číslo výrobku Cytion 820700a)
<b>Supplements</b>	Doplňte médium o 10 % FBS
<b>Dissociation Reagent</b>	Accutase
<b>Seeding density</b>	1 až $4 \times 10^4$ buniek/cm <sup>2</sup>
<b>Fluid renewal</b>	2 až 3-krát týždenne
<b>Freeze medium</b>	Ako kryokonzervačné médium používame kompletne rastové médium (vrátane FBS) + 10 % DMSO na zabezpečenie primeranej životaschopnosti po rozmrazení alebo CM-1 (katalógové číslo 800100 spoločnosti Cytion), ktoré obsahuje optimalizované osmoprotektanty a metabolické stabilizátory na zlepšenie regenerácie a zníženie stresu spôsobeného kryom.

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

1. Overte si, že injekčná liekovka zostane pri doručení hlboko zmrazená, pretože bunky sa prepravujú na suchom ľade, aby sa počas prepravy udržala optimálna teplota.
2. Po prijatí buď okamžite uskladnite kryovialku pri teplote nižšej ako -150 °C, aby ste zabezpečili zachovanie bunkovej integrity, alebo prejdite na krok 3, ak je potrebná okamžitá kultivácia.
3. V prípade okamžitej kultivácie injekčnú liekovku rýchlo rozmrazte ponorením do vodného kúpeľa s teplotou 37 °C s čistou vodou a antimikrobiálnym prostriedkom, pričom ju jemne miešajte 40 - 60 sekúnd, kým nezostane malý ľadový chumáč.
4. Všetky ďalšie kroky vykonajte v sterilných podmienkach v prietokovom digestore a pred otvorením kryovialku dezinfikujte 70 % etanolom.
5. Opatrne otvorte dezinfikovanú fľaštičku a preneste bunkovú suspenziu do 15 ml centrifugačnej skúmavky obsahujúcej 8 ml kultivačného média s izbovou teplotou a jemne premiešajte.
6. Zmes odstreďujte pri 300 x g počas 3 minút, aby sa bunky oddelili, a opatrne zlikvidujte supernatant obsahujúci zvyšky zmrazovacieho média.
7. Pelet buniek jemne resuspendujte v 10 ml čerstvého kultivačného média. V prípade adherentných buniek rozdeľte suspenziu medzi dve kultivačné banky T25; v prípade suspenzných kultúr preneste všetko médium do jednej banky T25, aby ste podporili účinnú interakciu a rast buniek.
8. Dodržiavajte zavedené subkultivačné protokoly na nepretržitý rast a udržiavanie bunkovej línie, čím sa zabezpečia spoľahlivé výsledky experimentov.

**Incubation  
Atmosphere**

37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ , zvlhčená atmosféra.

**Flask Coating**

Žiadne

**Shipping  
Conditions**

Kryokonzervované bunkové línie sa prepravujú na suchom ľade v overených, izolovaných obaloch s dostatočným množstvom chladiva na udržanie teploty približne -78 °C počas celej prepravy. Po prijatí ihneď skontrolujte obal a bezodkladne premiestnite injekčné liekovky do vhodného skladu.

**Storage  
Conditions**

Na dlhodobé uchovávanie umiestnite injekčné liekovky do kvapalnej fázy dusíka v pare pri teplote približne -150 až -196 °C. Skladovanie pri teplote -80 °C je prijateľné len ako krátky prechodný krok pred presunom do tekutého dusíka.

**PLAT-E bunky | 305855**

**Kontrola kvality / Genetický profil / HLA**

**Sterility**

Kontaminácia mykoplazmami sa vylučuje pomocou testov založených na PCR a metód detekcie mykoplazmiem založených na luminiscencii.

Aby sa zabezpečilo, že nedošlo ku kontaminácii baktériami, hubami alebo kvasinkami, bunkové kultúry sa denne vizuálne kontrolujú.