

PLAT-E celice | 305855

Splošne informacije

Description

Plat-E (Platinum-E) je celična linija za pakiranje retrovirusov, ki je bila ustvarjena na podlagi človeških embrionalnih ledvičnih celic 293T. Razvita je bila z namenom zagotoviti stabilen in učinkovit sistem za prehodno proizvodnjo ekotropnih retrovirusov z visokim titrom. Celična linija je bila konstruirana z uporabo novih konstrukcij za pakiranje, v katerih izražanje virusnih strukturnih genov – gag-pol in env – poganja človeški promotor EF1 α , ki je v celicah 293T bistveno močnejši od konvencionalnega promotorja MuLV z dolgim terminalnim ponovitvijo (LTR). Ta zasnova zagotavlja močno transkripcijsko aktivnost in podpira visoko raven proizvodnje virusnih komponent, potrebnih za učinkovito sestavljanje in pakiranje retrovirusov.

Celice Plat-E so bile ustvarjene s sekvenčno stabilno transfekcijo konstruktov pEnv-IRES-puro in pGag-pol-IRES-*bsr*, ki povezujejo virusne gene z markerji odpornosti proti antibiotikom prek notranjih mest za vstop v ribosom (IRES). Ta konfiguracija zagotavlja, da le celice, ki izražajo bistvene virusne gene, pridobijo tudi odpornost proti antibiotikom, kar omogoča selekcijo podklonov z visoko ekspresijo. Rezultatna linija Plat-E dosledno proizvaja retroviruse s titri do 1×10^7 infekcijskih enot na mililiter vsaj štiri mesece, ko se goji v dvojni selekciji s puromicinom in blasticidinom. Analize Northern blot, aktivnosti reverzne transkriptaze in pretočne citometrije so potrdile, da Plat-E kaže znatno višjo ekspresijo gag-pol in env kot predhodne linije za pakiranje, kot sta Bosc23 in Phoenix-E.

Arhitektura Plat-E zmanjšuje tveganje za nastanek retrovirusa, sposobnega za replikacijo (RCR), tako da omeji pakirne konstrukte le na potrebne kodirne regije virusnih strukturnih genov in jih loči na različne plazmide. Ta zasnova zahteva vsaj tri rekombinacijske dogodke za proizvodnjo RCR, s čimer se poveča biološka varnost. Plat-E se je izkazal za koristnega v aplikacijah za prenos genov, vključno z učinkovitim prenosom v primarne celice, kot so T-celice in mastociti. Zaradi svoje učinkovitosti in dolgoročne stabilnosti je zanesljiva platforma za proizvodnjo retrovirusnih vektorjev tako v temeljnem raziskovanju kot v predkliničnem razvoju genske terapije.

Organism Človek

Tissue Plodova ledvica

Synonyms Platinum-E

Značilnosti

Age Plod

Gender Ženske

Growth properties Pripadajoče

Regulativni podatki

Citation PLAT-E (kataloška številka Cytion 305855)

PLAT-E celice | 305855

Biosafety level 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_B488**GMO Status** GMO-S1: Ta celična linija za pakiranje retrovirusov (PLAT-E) vsebuje konstrukte, ki kodirajo gag-pol in env pod nadzorom promotorja EF1 α , kar omogoča proizvodnjo ekotropnih retrovirusnih delcev. Te spremembe so stabilno prisotne v celicah, pridobljenih iz linije HEK293T. Ta razvrstitev velja le v Nemčiji in se drugod lahko razlikuje.**Biomolekularni podatki****Mutational profile****Ravnanje s spletno stranjo****Culture Medium** RPMI 1640, w: 2,0 mM stabilnega glutamina, w: 2,0 g/L NaHCO₃ (številka izdelka Cytion 820700a)**Supplements** Gojišče dopolnite z 10 % FBS**Dissociation Reagent** Accutase**Seeding density** 1 do 4 x 10⁴ celic/cm²**Fluid renewal** 2 do 3-krat na teden**Freeze medium** Kot gojišče za kriokonzervacijo uporabljamo popolno rastno gojišče (vključno s FBS) + 10 % DMSO za ustrezno vitalnost po odmrznitvi ali CM-1 (kataloška številka 800100 podjetja Cytion), ki vključuje optimizirane osmoprotektante in presnovne stabilizatorje za izboljšanje okrevanja in zmanjšanje stresa, povzročene s kriom.

PLAT-E celice | 305855

Thawing and Culturing Cells

1. Prepričajte se, da je viala ob dostavi globoko zamrznjena, saj se celice pošiljajo na suhem ledu, da se med prevozom ohranijo optimalne temperature.
2. Po prejemu krioviala takoj shranite pri temperaturi pod $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, da zagotovite ohranitev celične celovitosti, ali pa nadaljujte s korakom 3, če je potrebno takojšnje gojenje.
3. Za takojšnje gojenje vialo hitro odtalite tako, da jo potopite v vodno kopel s čisto vodo in protimikrobnim sredstvom pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter 40-60 sekund nežno mešate, dokler ne ostane majhen ledeni kepica.
4. Vse nadaljnje korake izvajajte v sterilnih pogojih v pretočni nape, pred odprtjem pa kriovial razkužite s 70 % etanolom.
5. Previdno odprite razkuženo vialo in celično suspenzijo prenesite v 15-mililitrsko centrifugirno epruveto, ki vsebuje 8 ml gojišča sobne temperature, ter nežno premešajte.
6. Mešanico centrifugirajte pri $300 \times g$ 3 minute, da ločite celice, in previdno zavržite supernatant, ki vsebuje ostanke zamrzovalnega gojišča.
7. Pelet celic nežno ponovno suspendirajte v 10 ml svežega gojišča. Pri adherentnih celicah suspenzijo razdelite med dve bučki T25; pri suspenzijskih kulturah prenesite vse gojišče v eno bučko T25, da spodbudite učinkovito interakcijo in rast celic.
8. Upoštevajte uveljavljene protokole subkultur za nadaljnjo rast in vzdrževanje celične linije ter tako zagotovite zanesljive rezultate poskusov.

Incubation Atmosphere

$37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , vlažno ozračje.

Flask Coating

Nič

Shipping Conditions

Kriokonzervirane celične linije se pošiljajo na suhem ledu v potrjeni, izolirani embalaži z zadostno količino hladilnega sredstva, da se med prevozom vzdržuje približno $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ob prejemu takoj preglejte embalažo in vialo nemudoma prenesite v ustrezno skladišče.

Storage Conditions

Za dolgotrajno shranjevanje vialo postavite v tekoči dušik v parni fazi pri približno -150 do $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Shranjevanje pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ je sprejemljivo le kot kratek vmesni korak pred prenosom v tekoči dušik.

Nadzor kakovosti / Genetski profil / HLA

PLAT-E celice | 305855

Sterility

Kontaminacija z mikoplazmo se izključi z uporabo testov na podlagi PCR in metod za odkrivanje mikoplazme na podlagi luminiscence.

Da se zagotovi, da ni kontaminacije z bakterijami, glivami ali kvasovkami, se celične kulture dnevno vizualno pregledujejo.