

Клітини PLAT-E | 305855

Загальна інформація

Description

Plat-E (Platinum-E) — це клітинна лінія для упаковки ретровірусів, створена на основі клітин людської ембріональної нирки 293T. Вона була розроблена з метою забезпечення стабільної та ефективної системи для тимчасового виробництва екотропних ретровірусів з високим титром. Клітинна лінія була створена з використанням нових конструкцій для упаковки, в яких експресія структурних генів вірусу — gag-pol та env — регулюється промотором EF1 α людини, який є значно потужнішим у клітинах 293T, ніж традиційний промотор MuLV з довгим термінальним повтором (LTR). Така конструкція забезпечує високу транскрипційну активність та сприяє виробництву у великих кількостях вірусних компонентів, необхідних для ефективного складання та упаковки ретровірусів.

Клітини Plat-E були отримані шляхом послідовної стабільної трансфекції конструкцій рEnv-IRES-purog та рGag-pol-IRES-bsr, які пов'язують вірусні гени з маркерами антибіотикорезистентності через внутрішні сайти входу в рибосому (IRES). Така конфігурація гарантує, що лише клітини, які експресують необхідні вірусні гени, також набувають антибіотикорезистентності, що дозволяє відбирати субклони з високим рівнем експресії. Отримана лінія Plat-E стабільно продукує ретровіруси з титрами до 1×10^7 інфекційних одиниць на мілілітр протягом щонайменше чотирьох місяців при культивуванні в умовах подвійної селекції з пуроміцином та бластицидином. Аналізи методом Northern blot, визначення активності зворотної транскриптази та проточної цитометрії підтвердили, що Plat-E демонструє значно вищу експресію gag-pol та env, ніж попередні лінії упаковки, такі як Bosc23 та Phoenix-E.

Архітектура Plat-E мінімізує ризик утворення реплікаційно-компетентних ретровірусів (RCR) шляхом обмеження упаковних конструкцій лише необхідними кодуєчими ділянками структурних генів вірусу та їх розділення на різні плазміди. Ця конструкція вимагає щонайменше трьох рекомбінаційних подій для утворення RCR, тим самим підвищуючи біобезпеку. Plat-E виявився корисним у застосуваннях для перенесення генів, включаючи ефективну трансдукцію первинних клітин, таких як Т-клітини та тучні клітини. Його продуктивність та довгострокова стабільність роблять його надійною платформою для виробництва ретровірусних векторів як у фундаментальних дослідженнях, так і в доклінічній розробці генної терапії.

Organism Людина

Tissue Нирка плода

Synonyms Platinum-E

Характеристики

Age Плід

Gender Жінка

Growth properties Адепт

Клітини PLAT-E | 305855

Нормативні дані

Citation	PLAT-E (номер у каталозі Cytion 305855)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_B488
GMO Status	GMO-S1: Ця клітинна лінія для упаковки ретровірусів (PLAT-E) містить конструкти, що кодують гени gag-pol та env під контролем промотора EF1 α , що забезпечує виробництво екотропних ретровірусних частинок. Ці модифікації стабільно присутні в клітинах, похідних від HEK293T. Ця класифікація застосовується лише на території Німеччини і може відрізнятися в інших країнах.

Біомолекулярні дані

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

Обробка

Culture Medium	RPMI 1640, w: 2,0 мМ стабільний глютамін, w: 2,0 г/л NaHCO ₃ (номер за каталожним номером 820700a)
Supplements	Додайте до середовища 10% FBS
Dissociation Reagent	Аккутаза
Seeding density	від 1 до 4 × 10 ⁴ клітин/см ²
Fluid renewal	2-3 рази на тиждень
Freeze medium	Як середовище криоконсервування ми використовуємо повне живильне середовище (включаючи FBS) + 10% ДМСО для адекватної життєздатності після відтавання або CM-1 (номер за каталогом Cytion 800100), до складу якого входять оптимізовані осмопротектори та метаболічні стабілізатори для прискорення відновлення та зменшення кріоіндукованого стресу.

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

1. Переконайтеся, що віал залишається глибоко замороженим після доставки, оскільки клітини транспортуються на сухому льоду для підтримання оптимальної температури під час транспортування.
2. Після отримання негайно зберігайте кріовіал при температурі нижче -150°C , щоб забезпечити збереження клітинної цілісності, або перейдіть до кроку 3, якщо потрібне негайне культивування.
3. Для негайного культивування швидко розморозьте віал, зануливши його у водяну баню з чистою водою і антимікробним засобом при температурі 37°C , обережно перемішуючи протягом 40-60 секунд, поки не залишиться невелика крижана грудка.
4. Всі наступні кроки виконуйте в стерильних умовах у проточній витяжній шафі, дезінфікуючи кріовіал 70% етанолом перед відкриттям.
5. Обережно відкрийте продезінфікований флакон і перенесіть клітинну суспензію в 15 мл центрифужну пробірку, що містить 8 мл культурального середовища кімнатної температури, обережно перемішуючи.
6. Відцентрифугуйте суміш при $300 \times g$ протягом 3 хвилин, щоб відокремити клітини, і обережно викиньте надосадову рідину, що містить залишки заморожувального середовища.
7. Обережно ресуспендуйте осад клітин у 10 мл свіжого культурального середовища. Для адгезивних клітин розділіть суспензію між двома культуральними колбами T25; для суспензійних культур перенесіть все середовище в одну колбу T25, щоб сприяти ефективній взаємодії та росту клітин.
8. Дотримуйтеся встановлених протоколів субкультивування для продовження росту і підтримання клітинної лінії, забезпечуючи надійні результати експерименту.

**Incubation
Atmosphere**

37°C , 5% CO_2 , волога атмосфера.

Flask Coating

Ні

**Shipping
Conditions**

Кріоконсервовані клітинні лінії транспортуються на сухому льоду в перевірній ізольованій упаковці з достатньою кількістю холодоагенту для підтримання температури приблизно -78°C під час транспортування. При отриманні негайно огляньте контейнер і негайно перемістіть віали у відповідне місце для зберігання.

Клітини PLAT-E | 305855

Storage Conditions

Для тривалого зберігання помістіть флакони в парофазний рідкий азот при температурі від -150 до -196 °С. Зберігання при -80 °С допустиме лише як короткий проміжний етап перед перенесенням у рідкий азот.

Контроль якості / Генетичний профіль / HLA

Sterility

Зараження мікоплазмою виключається за допомогою аналізів на основі ПЛР та люмінесцентних методів виявлення мікоплазми.

Щоб переконатися у відсутності бактеріального, грибового або дріжджового забруднення, клітинні культури піддаються щоденному візуальному контролю.