Product sheet

A375-GFP | 305665

Обща информация

Description	A375-GFP е генетично модифициран вариант на клетъчната линия A375 на човешки злокачествен меланом, който стабилно експресира усилван зелен флуоресцентен протеин (eGFP). Първоначалната клетъчна линия A375 е получена от тумор на кожен меланом при възрастен пациент и се използва широко като модел за кожен меланом, особено за изследвания, свързани с онкогенния BRAF сигналинг, тъй като притежава мутацията BRAF V600E. Тази мутация води до конститутивна активация на MAPK/ERK сигналния път, стимулира пролиферацията и оцеляването и прави клетките A375 изключително подходящи за изследване на целеви терапии, като например инхибитори на BRAF и MEK. Дериватът, експресиращ GFP, запазва тези молекулярни и фенотипни характеристики, като същевременно позволява приложения, базирани на флуоресценция. Стабилното вграждане на репортера eGFP позволява визуализация в реално време на клетките A375-GFP както в системи in vitro, така и в системи in vivo. Флуоресцентната визуализация улеснява наблюдението на клетъчната пролиферация, миграция, инвазия и морфологични промени, както и проследяването на туморния растеж и метастатичното разпространение в модели с ксенографти. Подобреният вариант на GFP осигурява по-добра яркост и стабилност в сравнение с по-ранните GFP конструкции, което позволява чувствително откриване дори при малък брой клетки. Това прави A375-GFP особено полезен при експерименти с кокултури, платформи за изображения с високо съдържание и изследвания, изискващи прецизна пространствена резолюция на поведението на туморните клетки. A375-GFP запазва агресивния и пролиферативен фенотип на родителската линия на меланом, включително отзивчивостта към инхибитори на MAPK пътя и способността за инвазия и метастазиране в експериментални модели. Добавянето на GFP разширява приложимостта ѝ за скрининг на лекарства, визуализация на живи клетки и изследвания на взаимодействието между тумора и микросредата. Както и при други клетъчни линии, маркирани с репортер, за конкретни експериментални приложения се препоръчва валидиране на стабилността и постоянството на флуоресценцията през различните пасажи. **Генетична модификация:** Стабилно модифицирана чрез репликационно-некомпетентна лентивирусна трансдукция за експресия на репортера зелен флуоресцентен протеин ZsGreen1; поддържана като поликлонална популация при селекция с пуромицин (1–5 µg/mL). Ниво на биологична безопасност S1/BSL-1.
Organism	Човек
Tissue	Крак, кожа
Disease	Амеланотичен меланом

Характеристики

Age	54 години
Gender	Жена
Ethnicity	Кавказки

A375-GFP | 305665

Growth properties	Придържащи се

Регулаторни данни

Citation	A375-GFP (каталожен номер на Cytion 305665)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_QZ67
GMO Status	GMO-S1: Тази клетъчна линия съдържа стабилно интегриран репортер на зеления флуоресцентен протеин ZsGreen1, въведен чрез репликационно-некомпетентна лентивирусна трансдукция. Получената поликлонална клетъчна популация се поддържа при селекция с пуромицин (1–5 µg/mL). Необходимо е ниво на биологична безопасност S1. Тази класификация важи само в Германия и може да се различава в други страни.

Биомолекулярни данни

Antigen expression	ZsGreen1 (зелен флуоресцентен протеин)
Mutational profile	Мутация: BRAF, проста, p.Val600Glu (c.1799T>A), хомозиготна (от родителската клетъчна линия).Мутация, CDKN2A, проста, p.Glu61Ter (c.181G>T) (p.Gly75Val, c.224G>T), хомозиготна (от родителска клетъчна линия).Мутация, CDKN2A, проста, p.Glu69Ter (c.205G>T) (p.Gly83Val, c.248G>T), хомозиготна (от родителска клетъчна линия).Мутация, TERT, проста, c.1-146C>T (c.250C>T) (C250T), неуточнена, бележка = в промотора (от родителска клетъчна линия).

Работа с

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/L глюкоза, w: 4 mM L-глутамин, w: 3,7 g/L NaHCO3, w: 1,0 mM натриев пируват (номер на изделието на Cytion 820300a)
Supplements	Допълнете средата с 10% FBS
Dissociation Reagent	Accutase

A375-GFP | 305665

Subculturing	Отстранете старата среда от адхезивните клетки и ги промийте с PBS, която не съдържа калций и магнезий. За колби T25 използвайте 3-5 ml PBS, а за колби T75 - 5-10 ml. След това покрийте клетките изцяло с Accutase, като използвате 1-2 ml за колби T25 и 2,5 ml за колби T75. Оставете клетките да се инкубират на стайна температура за 8-10 минути, за да се отделят. След инкубацията внимателно разбъркайте клетките с 10 ml среда, за да ги ресуспендирате, след което центрофугирайте при 300xg за 3 минути. Изхвърлете супернатантата, ресуспендирайте клетките в прясна среда и ги прехвърлете в нови колби, които вече съдържат прясна среда.
Seeding density	1 до 3 x 10^4 клетки/cm^2
Fluid renewal	2 до 3 пъти седмично
Freeze medium	Като среда за криоконсервация използваме пълна хранителна среда + 10% DMSO за адекватна жизнеспособност след размразяване.
Thawing and Culturing Cells	1. Уверете се, че флаконът остава дълбоко замразен при доставката, тъй като клетките се транспортират със сух лед, за да се поддържат оптимални температури по време на транспортирането. 2. При получаване или съхранявайте незабавно криовиолата при температури под -150 °C, за да осигурите запазване на клетъчната цялост, или преминете към стъпка 3, ако е необходимо незабавно култивиране. 3. За незабавно култивиране бързо размразете флакона, като го потопите във водна баня с чиста вода и антимикробен агент с температура 37 °C, като разбърквате внимателно в продължение на 40-60 секунди, докато остане малка ледена бучка. 4. Извършвайте всички следващи стъпки при стерилни условия в аспиратор, като преди отваряне дезинфекцирате криовиолата със 70% етанол. 5. Внимателно отворете дезинфекцирания флакон и прехвърлете клетъчната суспензия в 15 ml центрофужна епруветка, съдържаща 8 ml хранителна среда със стайна температура, като разбъркате внимателно. 6. Центрофугирайте сместа при 200 x g в продължение на 5 минути, внимателно изхвърлете супернатантата, съдържаща средата за замразяване. 7. Следвайте процедурата, описана в раздел "Възстановяване след размразяване"
Incubation Atmosphere	37°C, 5%$_{CO2}$, овлажнена атмосфера.

Shipping Conditions	Криоконсервираните клетъчни линии се транспортират върху сух лед в утвърдени, изолирани опаковки с достатъчно хладилен агент, за да се поддържа приблизително -78 °C по време на транспортирането. При получаването незабавно прегледайте опаковката и незабавно прехвърлете флаконите за подходящо съхранение.
Storage Conditions	За дълготрайно съхранение поставете флаконите в течен азот в парна фаза при температура около -150 до -196 °C. Съхранението при -80 °C е приемливо само като кратък междинен етап преди прехвърлянето в течен азот.

Контрол на качеството и молекулярен анализ