

A375-GFP | 305665

Üldine teave

Description

A375-GFP on inimese pahaloomulise melanoomi rakuliini A375 geneetiliselt muundatud variant, mis ekspresseerib stabiilselt tugevdatud rohelist fluorestsentsvalku (eGFP). Algrakuliin A375 on saadud täiskasvanud patsiendi nahamelanoomi kasvajast ning seda kasutatakse laialdaselt nahamelanoomi mudelina, eriti uuringutes, mis käsitlevad onkogeenset BRAF-signaalmist, kuna see sisaldab BRAF V600E mutatsiooni. See mutatsioon põhjustab MAPK/ERK signaalitee konstitutiivset aktiveerumist, soodustades proliferatsiooni ja ellujäämist ning muutes A375-rakud väga sobivaks sihtterapiate, nagu BRAF- ja MEK-inhibiitorite uurimiseks. GFP-d ekspresseeriv derivaat säilitab need molekulaarsed ja fenotüübilised omadused, võimaldades samal ajal fluorestsentsipõhiseid rakendusi.

eGFP-reporteri stabiilne sisseviimine võimaldab A375-GFP-rakkude reaajas visualiseerimist nii in vitro kui ka in vivo süsteemides. Fluorestsentspildistamine hõlbustab rakkude proliferatsiooni, migratsiooni, invasiivsuse ja morfoloogiliste muutuste jälgimist, samuti kasvaja kasvu ja metastaaside leviku jälgimist ksenotransplantaadi mudelites. Täiustatud GFP-variant pakub varasemate GFP-konstruksioonidega võrreldes paremat heledust ja stabiilsust, võimaldades tundlikku tuvastamist isegi väikese rakukoguse korral. See muudab A375-GFP eriti kasulikuks ko-kultuuri katsetes, kõrge infosisaldusega pildistamisplatvormidel ning uuringutes, mis nõuavad kasvajakudede käitumise täpset ruumilist eraldusvõimet.

A375-GFP säilitab emaliini agressiivse ja proliferatiivse fenotüübi, sealhulgas reageerimisvõime MAPK-signaalsee inhibiitoritele ning invasiivsuse ja metastaaside tekkimise võime eksperimentaalsetes mudelites. GFP lisamine laiendab selle kasutusvõimalusi ravimite sõelumisel, elusrakkude pildistamisel ning kasvaja ja mikrokeskkonda vahelise interaktsiooni uuringutes. Nagu teistegi reportervalkudega märgistatud rakuliinide puhul, soovitatakse konkreetsete eksperimentaalsete rakenduste jaoks kontrollida fluorestsentsi stabiilsust ja järjepidevust erinevate passaažide vahel.

Organism Inimene

Tissue Jalg, nahk

Disease Amelanootiline melanoom

Omadused

Age 54 aastat

Gender Naised

Ethnicity Kaukaasia

Growth properties Kinnipeetav

Regulatiivsed andmed

A375-GFP | 305665

Citation	A375-GFP (Cytioni katalooginumber 305665)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_QZ67
GMO Status	GMO-S1: See inimese A375 melanoomi rakuliin sisaldab tugevdatud GFP ekspressioonikonstrukti, mis on viidud sisse lentiviirusvektori abil fluorestsentsse visualiseerimise eesmärgil. See klassifikatsioon kehtib ainult Saksamaal ja võib mujal erineda.

Biomolekulaarsed andmed

Antigen expression	ZsGreen1 (roheline fluorestsentsvalk)
Mutational profile	Mutatsioon: BRAF, lihtne, p.Val600Glu (c.1799T>A), homosügootne (pärib vanemrakuliinist). Mutatsioon, CDKN2A, lihtne, p.Glu61Ter (c.181G>T) (p.Gly75Val, c.224G>T), homosügootne (pärib vanemrakuliinist). Mutatsioon, CDKN2A, lihtne, p.Glu69Ter (c.205G>T) (p.Gly83Val, c.248G>T), homosügootne (pärib vanemrakuliinist). Mutatsioon, TERT, lihtne, c.1-146C>T (c.250C>T) (C250T), täpsustamata, märkus = promotoris (pärib vanemrakuliinist).

Töötlemine

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/L glükoosi, w: 4 mM L-glutamiini, w: 3,7 g/L NaHCO ₃ , w: 1,0 mM naatriumpüruvaati (Cytioni artikli number 820300a)
Supplements	Täiendada söötme 10% FBS-ga
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Eemaldage kleepunud rakkudel vana söötme ja peske neid PBS-ga, milles puudub kaltsium ja magneesium. T25 kolbide puhul kasutage 3-5 ml PBS-i ja T75 kolbide puhul 5-10 ml. Seejärel katke rakud täielikult Accutase'iga, kasutades 1-2 ml T25 kolbide puhul ja 2,5 ml T75 kolbide puhul. Laske rakkudel inkubeerida 8-10 minutit toatemperatuuril, et need eralduksid. Pärast inkubeerimist segage rakud ettevaatlikult 10 ml söötmega, et neid resuspenseerida, seejärel tsentrifuugige 3 minutit 300xg juures. Visake supernatant ära, suspenseerige rakud uuesti värskes keskkonnas ja viige need uutesse kolvidesse, mis sisaldavad juba värsket keskkonda.
Seeding density	1 kuni 3×10^4 rakku/cm ²

A375-GFP | 305665

Fluid renewal 2 kuni 3 korda nädalas

Freeze medium Krüosäilitusvedelikuna kasutame täielikku kasvukeskkonda + 10% DMSO, et tagada piisav elujõulisus pärast sulatamist.

Thawing and Culturing Cells

1. Veenduge, et vial jääb tarnimisel sügavkülmutatud, sest rakud transporditakse kuiva jääga, et säilitada optimaalne temperatuur transpordi ajal.
2. Pärast kättesaamist säilitage krüoviaal kas kohe temperatuuril alla $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, et tagada rakkude terviklikkuse säilimine, või jätkake sammuga 3, kui on vaja koheselt kultiveerida.
3. Kohese kultiveerimise korral sulatage vial kiiresti, kastes selle $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ veevanni puhta vee ja antimikroobse ainega, segades seda õrnalt 40-60 sekundit, kuni alles jääb väike jääklomp.
4. Tehke kõik järgmised toimingud steriilsetes tingimustes vooluhoodis, desinfitseerides krüoviaal enne avamist 70% etanooliga.
5. Avage desinfitseeritud vial ettevaatlikult ja viige rakususpensioon ettevaatlikult segades 15 ml tsentrifuugitorusse, mis sisaldab 8 ml toatemperatuuril olevat kasvukeskkonda.
6. Tsentrifugeerige segu 5 minutit $200 \times g$ juures, visake ettevaatlikult ära külmutusvedelikku sisaldav supernatant.
7. Järgige punktis "Taastamisjärgne taastamine" kirjeldatud menetlust

Incubation Atmosphere $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , niisutatud atmosfäär.

Shipping Conditions

Krüokonserveeritud rakuliinid transporditakse kuiva jääga valideeritud, isoleeritud pakendis, milles on piisavalt külmutusainet, et säilitada kogu transpordi jooksul ligikaudu $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vastuvõtmisel kontrollige konteinerit kohe ja viige vialid viivitamatult sobivasse hoiuruumi.

Storage Conditions

Pikaajaliseks säilitamiseks asetage vialid aurufaasis vedela lämmastikuga umbes -150 kuni $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures. Säilitamine temperatuuril $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ on vastuvõetav ainult lühikese vaheetapina enne vedela lämmastikuga üleviimist.

Kvaliteedikontroll / Geneetiline profiil / HLA