

A375-GFP | 305665

Yleisiä tietoja

Description

A375-GFP on ihmisen pahanlaatuisen melanooman solulinjan A375 geneettisesti muunnettu variantti, joka ilmentää vakaasti tehostettua vihreää fluoresoivaa proteiinia (eGFP). Alkuperäinen A375-solulinja on peräisin aikuispotilaan ihomelanoomakasvaimesta, ja sitä käytetään laajalti ihomelanooman mallina, erityisesti tutkimuksissa, jotka liittyvät onkogeneeniseen BRAF-signaalointiin, sillä se kantaa BRAF V600E -mutaatiota. Tämä mutaatio johtaa MAPK/ERK-signaalointireitin jatkuvaan aktivoitumiseen, mikä edistää solujen lisääntymistä ja selviytymistä ja tekee A375-soluista erittäin merkityksellisiä kohdennettujen hoitojen, kuten BRAF- ja MEK-estäjien, tutkimuksessa. GFP:tä ilmentävä johdannainen säilyttää nämä molekyyliset ja fenotyypiset ominaisuudet samalla kun se mahdollistaa fluoresenssipohjaiset sovellukset.

eGFP-raporttoijan vakaa sisällyttäminen mahdollistaa A375-GFP-solujen reaaliaikaisen visualisoinnin sekä in vitro- että in vivo -järjestelmissä. Fluoresenssikuvantaminen helpottaa solujen proliferaation, migraation, invaasion ja morfologisten muutosten seuranta sekä kasvaimen kasvun ja metastaattisen leviämisen seuranta ksenotransplantaattimalleissa. Tehostettu GFP-variantti tarjoaa paremman kirkkauden ja vakauden verrattuna aikaisempiin GFP-konstruktioihin, mikä mahdollistaa herkin havaitsemisen jopa pienillä solumäärillä. Tämä tekee A375-GFP:stä erityisen hyödyllisen yhteisviljelykokeissa, korkean sisällön kuvantamisalustoilla sekä tutkimuksissa, jotka vaativat tarkkaa spatiaalista resoluutiota kasvainsolujen käyttäytymisen tarkastelussa.

A375-GFP säilyttää emomelanoomalinjan aggressiivisen ja proliferaatiivisen fenotyypin, mukaan lukien herkkyuden MAPK-reitin estäjille sekä invaasio- ja metastaasikyvyn kokeellisissa malleissa. GFP:n lisääminen laajentaa sen käyttökelpoisuutta lääkeaineiden seulonnassa, elävien solujen kuvantamisessa sekä kasvaimen ja mikroympäristön välisten vuorovaikutusten tutkimuksissa. Kuten muidenkin raportointigeenillä merkittyjen solulinjojen kohdalla, fluoresenssin vakauden ja yhdenmukaisuuden validointi soluviljelmien siirtojen välillä on suositeltavaa tiettyjä kokeellisia sovelluksia varten.

Geneettinen muuntelu: Stabiilisti muunnettu replikaatiokyvyn lentiviruksen välityksellä ilmentämään ZsGreen1-vihreää fluoresoivaa proteiinireporteria; ylläpidetään polyklonaalisena populaationa puromysiinivalinnassa (1–5 µg/mL). S1/BSL-1-turvaluokitus.

Organism

Ihminen

Tissue

Jalka, iho

Disease

Amelanootin melanooma

Ominaisuudet

Age

54 vuotta

Gender

Nainen

Ethnicity

Kaukasialainen

A375-GFP | 305665

Growth properties

Tarttuva

Säätelytiedot

Citation A375-GFP (Cytionin tuotenumero 305665)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_QZ67

GMO Status GMO-S1: Tämä solulinja sisältää stabiilisti integroidun ZsGreen1-vihreän fluoresoivan proteiinin raportointigeenin, joka on tuotu soluun replikaatiokyvottomän lentiviruksen välityksellä. Tuloksena saatu polyklonaalinen solupopulaatio ylläpidettiin puromysiiniselektiossa (1–5 µg/ml). S1-turvaluokitus vaaditaan. Tämä luokitus koskee vain Saksaa ja voi olla erilainen muualla.

Biomolekyyli tiedot

Antigen expression ZsGreen1 (vihreä fluoresoiva proteiini)

Mutational profile Mutaatio: BRAF, yksinkertainen, p.Val600Glu (c.1799T>A), homotsygoottinen (peräisin emosolulinjasta). Mutaatio, CDKN2A, yksinkertainen, p.Glu61Ter (c.181G>T) (p.Gly75Val, c.224G>T), homotsygoottinen (peräisin vanhemman solulinjasta). Mutaatio, CDKN2A, yksinkertainen, p.Glu69Ter (c.205G>T) (p.Gly83Val, c.248G>T), homotsygoottinen (peräisin emosolulinjasta). Mutaatio, TERT, yksinkertainen, c.1-146C>T (c.250C>T) (C250T), määrittelemätön, huomautus = promootorissa (peräisin vanhemman solulinjasta).

Käsittely

Culture Medium DMEM, w: 4,5 g/l glukoosia, w: 4 mM L-glutamiinia, w: 3,7 g/l NaHCO₃, w: 1,0 mM natriumpyruvaattia (Cytionin artikkelinumero 820300a)**Supplements** Täydennetään elatusainetta 10 %:lla FBS:llä**Dissociation Reagent** Accutase

A375-GFP | 305665

Subculturing

Poista vanha väliaine tarttuneista soluista ja pese ne PBS:llä, josta puuttuu kalsiumia ja magnesiumia. Käytä T25-pulloissa 3-5 ml PBS:ää ja T75-pulloissa 5-10 ml. Peitä sitten solut kokonaan Accutase-valmisteella, käyttäen 1-2 ml T25-pulloissa ja 2,5 ml T75-pulloissa. Anna solujen inkuboitua huoneenlämmössä 8-10 minuuttia solujen irtoamiseksi. Inkuboinnin jälkeen solut sekoitetaan varovasti 10 ml:n väliaineella niiden resuspendoimiseksi ja sentrifugoidaan sitten 300xg:n nopeudella 3 minuutin ajan. Hävitä supernatantti, suspendoi solut uudelleen tuoreeseen väliaineeseen ja siirrä ne uusiin pulloihin, jotka sisältävät jo tuoretta väliaineita.

Seeding density
 $1-3 \times 10^4$ solua/cm²
Fluid renewal

2-3 kertaa viikossa

Freeze medium

Kryosäilytysmediana käytämme täydellistä kasvualustaa + 10 % DMSO:ta, jotta elinkelpoisuus olisi riittävä sulatuksen jälkeen.

Thawing and Culturing Cells

1. Varmista, että injektioipullo pysyy syväjäädetytynä toimitettaessa, sillä solut kuljetetaan kuivajäädessä, jotta optimaalinen lämpötila säilyy kuljetuksen aikana.
2. Vastaanotettaessa kryopullo joko säilytetään välittömästi alle -150 °C:n lämpötilassa solujen eheyden säilyttämiseksi tai edetään vaiheeseen 3, jos tarvitaan välitöntä viljelyä.
3. Välitöntä viljelyä varten sulata injektioipullo nopeasti upottamalla se 37 °C:n vesihauteeseen, jossa on puhdasta vettä ja mikrobilääkettä, ja sekoittamalla sitä varovasti 40-60 sekunnin ajan, kunnes jäädästä on jäljellä pieni jäämöhkäle.
4. Suorita kaikki seuraavat vaiheet steriileissä olosuhteissa virtaushupussa ja desinfioi kryopullo 70-prosenttisella etanolilla ennen avaamista.
5. Avaa desinfioitu injektioipullo varovasti ja siirrä solususpensio 15 ml:n sentrifugiputkeen, joka sisältää 8 ml huoneenlämpöistä elatusainetta, varovasti sekoittaen.
6. Sentrifugoi seosta 200 x g:n voimakkuudella 5 minuuttia ja hävitä varovasti pakastusmediaa sisältävä supernatantti.
7. Noudatetaan kohdassa Sulattamisen jälkeinen talteenotto kuvattua menettelyä

Incubation Atmosphere37 °C, 5 % CO₂, kostutettu ilmakehä.

A375-GFP | 305665

Shipping Conditions

Kryosäilytetyt solulinjat kuljetetaan kuivajäässä validoidussa, eristetyssä pakkauksessa, jossa on riittävästi kylmäainetta, jotta lämpötila pysyy noin -78 °C:ssa koko kuljetuksen ajan. Pakkaus on tarkastettava välittömästi sen vastaanottamisen jälkeen ja injektiopullot on siirrettävä viipymättä asianmukaiseen varastoon.

Storage Conditions

Pitkäaikaissäilytystä varten injektiopullot asetetaan höyryfaasissa olevaan nestemäiseen tyypeen noin -150 - -196 °C:een. Säilytys -80 °C:ssa on hyväksyttävää vain lyhyenä välivaiheena ennen siirtoa nestemäiseen tyypeen.

Laadunvalvonta ja molekyylianalyysi