

A375-GFP | 305665

Informazioni generali

Description

A375-GFP è una variante geneticamente modificata della linea cellulare A375 del melanoma maligno umano, che esprime in modo stabile la proteina fluorescente verde potenziata (eGFP). La linea cellulare parentale A375 deriva da un tumore di melanoma cutaneo in un paziente adulto ed è ampiamente utilizzata come modello per il melanoma cutaneo, in particolare per studi che coinvolgono la segnalazione oncogenica di BRAF, poiché presenta la mutazione BRAF V600E. Questa mutazione porta all'attivazione costitutiva della via MAPK/ERK, favorendo la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule e rendendo le cellule A375 particolarmente rilevanti per lo studio di terapie mirate, quali gli inibitori di BRAF e MEK. Il derivato che esprime la GFP conserva queste caratteristiche molecolari e fenotipiche, consentendo al contempo applicazioni basate sulla fluorescenza.

L'incorporazione stabile del reporter eGFP consente la visualizzazione in tempo reale delle cellule A375-GFP sia in sistemi in vitro che in vivo. L'imaging a fluorescenza facilita il monitoraggio della proliferazione, della migrazione, dell'invasione e dei cambiamenti morfologici delle cellule, nonché il tracciamento della crescita tumorale e della diffusione metastatica nei modelli di xenotrapianto. La variante potenziata della GFP offre maggiore luminosità e stabilità rispetto ai precedenti costrutti GFP, consentendo un rilevamento sensibile anche in presenza di un numero ridotto di cellule. Ciò rende l'A375-GFP particolarmente utile negli esperimenti di cocultura, nelle piattaforme di imaging ad alto contenuto e negli studi che richiedono una risoluzione spaziale precisa del comportamento delle cellule tumorali.

A375-GFP mantiene il fenotipo aggressivo e proliferativo della linea di melanoma parentale, compresa la risposta agli inibitori della via MAPK e la capacità di invasione e metastasi nei modelli sperimentali. L'aggiunta della GFP ne amplia l'utilità per lo screening farmacologico, l'imaging su cellule vive e gli studi sull'interazione tra tumore e microambiente. Come per altre linee cellulari marcate con reporter, per applicazioni sperimentali specifiche si raccomanda la validazione della stabilità e dell'uniformità della fluorescenza nel corso dei passaggi.

Modifica genetica: modificata in modo stabile tramite trasduzione lentivirale a replicazione incompetente per esprimere il reporter della proteina fluorescente verde ZsGreen1; mantenuta come popolazione policlonale sotto selezione con puromicina (1–5 µg/mL). Contenimento S1/BSL-1.

Organism	Umano
Tissue	Gamba, pelle
Disease	Melanoma amelanotico

Caratteristiche

Age	54 anni
Gender	Donna
Ethnicity	Caucasico

A375-GFP | 305665**Growth properties**

Aderente

Dati normativi**Citation** A375-GFP (codice catalogo Cytion 305665)**Biosafety level** 1**NCBI_TaxID** 9606**CellosaurusAccession** CVCL_QZ67

GMO Status GMO-S1: Questa linea cellulare contiene un reporter della proteina fluorescente verde ZsGreen1 integrato in modo stabile, introdotto tramite trasduzione lentivirale incompetente alla replicazione. La popolazione cellulare policlonale così ottenuta è stata mantenuta sotto selezione con puromicina (1–5 µg/mL). È richiesto il livello di contenimento S1. Questa classificazione è valida solo in Germania e potrebbe differire in altri paesi.

Dati biomolecolari

Antigen expression ZsGreen1 (proteina fluorescente verde)

Mutational profile Mutazione: BRAF, semplice, p.Val600Glu (c.1799T>A), omozigote (derivante dalla linea cellulare parentale). Mutazione, CDKN2A, semplice, p.Glu61Ter (c.181G>T) (p.Gly75Val, c.224G>T), omozigote (dalla linea cellulare parentale). Mutazione, CDKN2A, Semplice, p.Glu69Ter (c.205G>T) (p.Gly83Val, c.248G>T), Omozigote (dalla linea cellulare parentale). Mutazione, TERT, Semplice, c.1-146C>T (c.250C>T) (C250T), Non specificata, Nota=Nel promotore (dalla linea cellulare parentale).

Manipolazione

Culture Medium DMEM, w: 4,5 g/L di glucosio, w: 4 mM di L-Glutammina, w: 3,7 g/L di NaHCO₃, w: 1,0 mM di piruvato di sodio (articolo Cytion numero 820300a)

Supplements Integrare il terreno di coltura con il 10% di FBS

Dissociation Reagent Accutase

A375-GFP | 305665**Subculturing**

Rimuovere il vecchio terreno dalle cellule aderenti e lavarle con PBS privo di calcio e magnesio. Per le fiasche T25, utilizzare 3-5 ml di PBS e per le fiasche T75, 5-10 ml. Quindi, coprire completamente le cellule con Accutase, utilizzando 1-2 ml per le fiasche T25 e 2,5 ml per le fiasche T75. Lasciare incubare le cellule a temperatura ambiente per 8-10 minuti per staccarle. Dopo l'incubazione, mescolare delicatamente le cellule con 10 ml di terreno per risospenderle, quindi centrifugare a 300xg per 3 minuti. Scartare il surnatante, risospendere le cellule in terreno fresco e trasferirle in nuove fiasche contenenti terreno fresco.

Seeding density

Da 1 a 3×10^4 cellule/cm²

Fluid renewal

da 2 a 3 volte alla settimana

Freeze medium

Come terreno di crioconservazione, utilizziamo un terreno di crescita completo + 10% DMSO per ottenere un'adeguata vitalità post-scongellamento.

Thawing and Culturing Cells

1. Verificare che la fiala rimanga profondamente congelata al momento della consegna, poiché le cellule vengono spedite con ghiaccio secco per mantenere le temperature ottimali durante il trasporto.
2. Al ricevimento, conservare immediatamente la criovial a temperature inferiori a -150°C per garantire la conservazione dell'integrità cellulare, oppure procedere al punto 3 se è necessaria una coltura immediata.
3. Per la coltura immediata, scongelare rapidamente la fiala immergendola in un bagno d'acqua a 37°C con acqua pulita e un agente antimicrobico, agitando delicatamente per 40-60 secondi finché non rimane un piccolo grumo di ghiaccio.
4. Eseguire tutte le fasi successive in condizioni di sterilità in una cappa a flusso, disinfettando la criovial con etanolo al 70% prima dell'apertura.
5. Aprire con cautela la fiala disinfettata e trasferire la sospensione cellulare in una provetta da centrifuga da 15 ml contenente 8 ml di terreno di coltura a temperatura ambiente, mescolando delicatamente.
6. Centrifugare la miscela a 200 x g per 5 minuti, scartando con cura il surnatante contenente il terreno di congelamento.
7. Seguire la procedura descritta in Recupero post-scongellamento

Incubation Atmosphere

37°C, 5% CO₂, atmosfera umidificata.

A375-GFP | 305665

Shipping Conditions

Le linee cellulari crioconservate vengono spedite su ghiaccio secco in confezioni isolate e convalidate, con una quantità di refrigerante sufficiente a mantenere circa -78 °C durante il trasporto. Al ricevimento, ispezionare immediatamente il contenitore e trasferire immediatamente le fiale in un luogo di conservazione appropriato.

Storage Conditions

Per la conservazione a lungo termine, porre le fiale in azoto liquido in fase vapore a una temperatura compresa tra -150 e -196 °C circa. La conservazione a -80 °C è accettabile solo come breve fase intermedia prima del trasferimento in azoto liquido.

Controllo qualità e analisi molecolare