

A375-GFP | 305665

Bendra informacija

Description

A375-GFP yra genetiškai modifikuotas žmogaus piktybinės melanomos ląstelių linijos A375 variantas, kuriame stabiliai ekspresuojamas sustiprintas žaliasis fluorescuojantis baltymas (eGFP). Pirminė A375 ląstelių linija yra gauta iš suaugusio paciento odos melanomos naviko ir plačiai naudojama kaip odos melanomos modelis, ypač tyrimuose, susijusiuose su onkogeniniu BRAF signalizavimu, nes joje yra BRAF V600E mutacija. Ši mutacija sukelia nuolatinę MAPK/ERK signalo kelio aktyvaciją, skatinančią ląstelių proliferaciją ir išlikimą, todėl A375 ląstelės yra labai tinkamos tikslinio gydymo, pavyzdžiui, BRAF ir MEK inhibitorių, tyrimams. GFP ekspresuojantis variantas išlaiko šias molekulinės ir fenotipinės savybes, tuo pačiu sudarydamas galimybes taikyti fluorescencijos pagrįstus metodus.

Stabilus eGFP reporterio įterpimas leidžia realiuoju laiku stebėti A375-GFP ląsteles tiek in vitro, tiek in vivo sistemose. Fluorescencinis vaizdavimas palengvina ląstelių proliferacijos, migracijos, invazijos ir morfologinių pokyčių stebėjimą, taip pat naviko augimo ir metastazių plitimo sekimą ksenotransplantacijos modeliuose. Patobulintas GFP variantas, palyginti su ankstesniais GFP konstruktais, užtikrina didesnį ryškumą ir stabilumą, todėl leidžia jautriai aptikti net esant mažam ląstelių skaičiui. Dėl to A375-GFP yra ypač naudinga atliekant bendros kultūros eksperimentus, naudojant didelės informacijos talpos vaizdinimo platformas ir atliekant tyrimus, kuriuose reikalinga tiksli naviko ląstelių elgesio erdvinė skiriamoji geba.

A375-GFP išlaiko pirminės melanomos linijos agresyvų ir proliferacinį fenotipą, įskaitant reakciją į MAPK kelio inhibitorius bei invazijos ir metastazavimo gebėjimus eksperimentiniuose modeliuose. GFP įtraukimas išplečia jo pritaikymo galimybes vaistų atrankai, gyvų ląstelių vaizdinimui ir naviko bei mikroaplinkos sąveikos tyrimams. Kaip ir kitų reporterinių žymeklių pažymėtų ląstelių linijų atveju, konkretiems eksperimentiniams taikymams rekomenduojama patikrinti fluorescencijos stabilumą ir nuoseklumą per visus pasėlių kartus.

Genetinė modifikacija: stabiliai modifikuota replikacijos nesugebančiu lentivirusiniu transdukavimu, kad ekspresuotų „ZsGreen1“ žalios fluorescencijos baltymo reporterį; išlaikoma kaip polikloninė populiacija, atrinkta puomicinu (1–5 µg/mL). S1/BSL-1 saugumo lygis.

Organism

Žmogus

Tissue

Kojos, oda

Disease

Amelanotinė melanoma

Charakteristikos

Age

54 metai

Gender

Moteris

Ethnicity

Kaukaziečių

Growth properties

Priglundęs

A375-GFP | 305665

Reguliavimo duomenys

Citation	A375-GFP (Cytion katalogo numeris 305665)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_QZ67
GMO Status	GMO-S1: Šioje ląstelių linijoje yra stabiliai integruotas žalios fluorescencijos baltymo „ZsGreen1“ reporteris, įvestas naudojant replikacijos nesugebančią lentivirusinę transdukciją. Gauta polikloninė ląstelių populiacija buvo išlaikyta atliekant selekciją puromicinu (1–5 µg/mL). Reikalaujamas S1 saugumo lygis. Ši klasifikacija galioja tik Vokietijoje ir kitose šalyse gali skirtis.

Biomolekuliniai duomenys

Antigen expression	ZsGreen1 (žaliasis fluorescuojantis baltymas)
Mutational profile	Mutacija: BRAF, paprasta, p.Val600Glu (c.1799T>A), homozigotinė (iš tėvinės ląstelių linijos). Mutacija, CDKN2A, paprasta, p.Glu61Ter (c.181G>T) (p.Gly75Val, c.224G>T), homozigotinė (iš tėvinės ląstelių linijos). Mutacija, CDKN2A, paprasta, p.Glu69Ter (c.205G>T) (p.Gly83Val, c.248G>T), homozigotinė (iš tėvinės ląstelių linijos). Mutacija, TERT, paprasta, c.1-146C>T (c.250C>T) (C250T), nenurodyta, pastaba = promotoriuje (iš tėvinės ląstelių linijos).

Tvarkymas

Culture Medium	DMEM, š: 4,5 g/l gliukozės, š: 4 mM L-glutamino, š: 3,7 g/l NaHCO ₃ , š: 1,0 mM natrio piruvato (Cytion gaminio numeris 820300a)
Supplements	Papildykite terpę 10 % FBS
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Pašalinkite seną terpę nuo prilipusių ląstelių ir nuplaukite jas PBS, kuriame nėra kalcio ir magnio. T25 kolboms naudokite 3-5 ml PBS, o T75 kolboms - 5-10 ml. Tuomet visiškai užpilkite ląsteles "Accutase", naudodami 1-2 ml T25 kolboms ir 2,5 ml T75 kolboms. Leiskite ląstelėms inkubuotis kambario temperatūroje 8-10 minučių, kad jos atsiskirtų. Po inkubacijos atsargiai sumaišykite ląsteles su 10 ml terpės, kad jos vėl suspenduotų, tada 3 minutes centrifuguokite 300xg greičiu. Išmeskite supernatantą, vėl sutirpinkite ląsteles šviežioje terpėje ir perkeltkite jas į naujas kolbas, kuriose jau yra šviežia terpė.

A375-GFP | 305665

Seeding density 1–3 x 10⁴ ląstelės/cm²

Fluid renewal 2-3 kartus per savaitę

Freeze medium Kaip kriokonservavimo terpę naudojame visišką augimo terpę + 10 % DMSO, kad būtų užtikrintas tinkamas gyvybingumas po atšildymo.

Thawing and Culturing Cells

1. Patikrinkite, ar pristatant buteliuką jis išlieka gerai užšaldytas, nes ląstelės gabenamos ant sauso ledo, kad gabenimo metu būtų palaikoma optimali temperatūra.
2. Gavę iš karto laikykite kriovialą žemesnėje nei -150 °C temperatūroje, kad užtikrintumėte ląstelių vientisumo išsaugojimą, arba pereikite prie 3 veiksmo, jei reikia nedelsiant kultivuoti.
3. Jei norite nedelsiant pradėti kultivuoti, greitai atšildykite buteliuką panardindami jį į 37 °C temperatūros vandens vonelę su švariu vandeniu ir antimikrobine priemone, švelniai maišydami 40-60 sekundžių, kol liks nedidelis ledo gabalėlis.
4. Visus tolesnius veiksmus atlikite steriliomis sąlygomis srauto gaubte, prieš atidarydami kriovialą dezinfekuokite jį 70 % etanolio.
5. Atsargiai atidarykite dezinfekuotą buteliuką ir perpilkite ląstelių suspensiją į 15 ml centrifugos mėgintuvėlį, kuriame yra 8 ml kambario temperatūros mitybinės terpės, atsargiai išmaišykite.
6. Mišinį centrifuguokite 200 x g greičiu 5 minutes, atsargiai išmeskite supernatantą su šaldymo terpe.
7. Atlikite procedūrą, aprašytą skyriuje "Atkūrimas po atšildymo"

Incubation Atmosphere 37 °C, 5 % CO₂, drėkintoje atmosferoje.

Shipping Conditions

Kriokonservuotos ląstelių linijos gabenamos ant sauso ledo patvirtintoje, izoliuotoje pakuotėje su pakankamu kiekiu šaldymo skysčio, kad pervežimo metu būtų palaikoma maždaug -78 °C temperatūra. Gavę pakuotę, nedelsdami ją apžiūrėkite ir nedelsdami perkeltite mėgintuvėlius į tinkamą saugyklą.

Storage Conditions

Norėdami ilgai saugoti, įdėkite buteliukus į garų fazės skystą azotą maždaug -150-196 °C temperatūroje. Laikymas -80 °C temperatūroje yra priimtinas tik kaip trumpas tarpinis etapas prieš perkelti į skystąjį azotą.

A375-GFP | 305665

Kokybės kontrolė ir molekulinė analizė