

**Komórki A375 | 300110****Informacje ogólne****Description**

Linia komórek czerniaka ludzkiego A375, wyizolowana ze skóry 54-letniej pacjentki z czerniakiem złośliwym, stanowi ważne źródło informacji w badaniach nad rakiem, zwłaszcza w badaniach nad czerniakiem ludzkim, jednym z najbardziej agresywnych rodzajów raka skóry. Linia komórkowa A375 znana jest z szybkiego tempa wzrostu i wysokiego potencjału nowotworowego, dzięki czemu nadaje się do różnych zastosowań eksperymentalnych, w tym do badań in vitro nad proliferacją, migracją i inwazją komórek, a także do testów nowotworzenia in vivo.

Komórki A375 wykazują wysoki potencjał nowotworowy u myszy z obniżoną odpornością, tworząc szybko rosnące czerniaki bezbarwne. Obecność mutacji BRAFV600E w komórkach A375 sprawia, że są one bardzo wrażliwe na hamowanie MEK, co stanowi cenne narzędzie do badania terapii celowanych w leczeniu czerniaka. Wykazano na przykład, że leczenie komórek A375 vemurafenibem wzmacnia indukcję cząsteczek MHC klasy I i klasy II, co pozwala lepiej zrozumieć interakcje między komórkami czerniaka a układem odpornościowym.

Oprócz roli w podstawowych badaniach nad czerniakiem, komórki A375 są wykorzystywane w badaniach przesiewowych leków oraz w badaniach szlaków sygnałowych związanych z przeżywalnością, proliferacją i przerzutami komórek nowotworowych. Komórki A375 są również wykorzystywane w badaniach nad apoptozą, a izogeniczne linie komórkowe A375 oraz wprowadzenie białek reporterowych, takich jak Luc (luc2), umożliwiają badanie funkcji genów i monitorowanie reakcji komórkowych w czasie rzeczywistym. Przydatność komórek A375 jako gospodarza transfekcji oraz ich wykorzystanie w stabilnych liniach komórkowych reporterowych również przyczynia się do ich wszechstronności w zastosowaniach badawczych.

Podsumowując, ludzka linia komórkowa czerniaka A375 jest kluczowym narzędziem w badaniach nad czerniakiem u ludzi, oferując kompleksowy model do badania mechanizmów molekularnych i komórkowych leżących u podstaw progresji czerniaka, skuteczności środków terapeutycznych oraz interakcji między komórkami nowotworowymi a układem odpornościowym.

**Organism** Człowiek**Tissue** Skóra**Disease** Czerniak**Synonyms** A 375, A-375, A375-MEL, A375-mel, A375mel**Charakterystyka****Age** 54 lata**Gender** Kobieta**Morphology** Podobny do nabłonka

**Komórki A375 | 300110**

**Growth properties** Adherent

**Dane regulacyjne**

**Citation** A375 (numer katalogowy Cytion 300110)

**Biosafety level** 1

**NCBI\_TaxID** 9606

**CellosaurusAccession** CVCL\_0132

**Dane biomolekularne**

**Antigen expression** P53 dodatni

**Tumorigenic** Tak, u nagich myszy

**Mutational profile** BRAF V600Emut

**Karyotype** Komórki A375 charakteryzują się hipotriploidalnym karyotypem, z modalną liczbą chromosomów wynoszącą 62 i obecnością dziewięciu chromosomów markerowych w każdej komórce, co podkreśla zmiany genetyczne związane z czerniakiem złośliwym.

**Obsługa**

**Culture Medium** DMEM, w: 4,5 g/l glukozy, w: 4 mM L-glutaminy, w: 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>, w: 1,0 mM pirogronianu sodu (numer artykułu Cytion 820300a)

**Supplements** Uzupelnic podloze 10% FBS

**Dissociation Reagent** Accutase

**Doubling time** 20 godzin

## Komórki A375 | 300110

<b>Subculturing</b>	Usuń starą pożywkę z przylegających komórek i przemyj je PBS, który nie zawiera wapnia i magnezu. W przypadku kolb T25 należy użyć 3-5 ml PBS, a w przypadku kolb T75 5-10 ml. Następnie całkowicie pokryj komórki Accutase, używając 1-2 ml dla kolb T25 i 2,5 ml dla kolb T75. Pozwól komórkom inkubować w temperaturze pokojowej przez 8-10 minut, aby je oddzielić. Po inkubacji delikatnie wymieszaj komórki z 10 ml pożywki, aby ponownie je zawiesić, a następnie odwiruj przy 300xg przez 3 minuty. Odrzuć supernatant, ponownie zawiesić komórki w świeżej pożywce i przenieść je do nowych kolb zawierających już świeżą pożywkę.
<b>Split ratio</b>	Zalecane są proporcje od 1:3 do 1:8
<b>Seeding density</b>	$1 \times 10^4$ komórek/cm <sup>2</sup> spowoduje powstanie zlewającej się monowarstwy w ciągu 4 dni.
<b>Fluid renewal</b>	2 do 3 razy w tygodniu
<b>Post-Thaw Recovery</b>	Po rozmrożeniu umieść komórki na płytce w ilości $4 \times 10^4$ komórek/cm <sup>2</sup> i pozostaw je na co najmniej 24 godziny, aby mogły się zregenerować po procesie zamrażania i przyłączyć do podłoża.
<b>Freeze medium</b>	Jako pożywki do kriokonserwacji używamy kompletnej pożywki wzrostowej (w tym FBS) + 10% DMSO w celu zapewnienia odpowiedniej żywotności po rozmrożeniu lub CM-1 (numer katalogowy Cytion 800100), która zawiera zoptymalizowane osmoprotektanty i stabilizatory metaboliczne w celu zwiększenia regeneracji i zmniejszenia stresu wywołanego kriokonserwacją.

## Komórki A375 | 300110

### Thawing and Culturing Cells

1. Upewnij się, że fiolka pozostaje głęboko zamrożona w momencie dostawy, ponieważ komórki są wysyłane w suchym lodzie, aby utrzymać optymalną temperaturę podczas transportu.
2. Po otrzymaniu należy natychmiast przechowywać fiolkę w temperaturze poniżej  $-150^{\circ}\text{C}$ , aby zapewnić zachowanie integralności komórek, lub przejść do kroku 3, jeśli wymagana jest natychmiastowa hodowla.
3. W przypadku natychmiastowej hodowli należy szybko rozmrozić fiolkę, zanurzając ją w łaźni wodnej o temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  z czystą wodą i środkiem przeciwdrobnoustrojowym, delikatnie mieszając przez 40-60 sekund, aż pozostanie niewielka grudka lodu.
4. Wykonaj wszystkie kolejne kroki w sterylnych warunkach w kapturze przepływowej, dezynfekując fiolkę 70% etanolem przed otwarciem.
5. Ostrożnie otworzyć zdezynfekowaną fiolkę i przenieść zawiesinę komórek do 15 ml probówki wirówkowej zawierającej 8 ml podłoża hodowlanego o temperaturze pokojowej, delikatnie mieszając.
6. Wirować mieszaninę z prędkością  $300 \times g$  przez 3 minuty w celu oddzielenia komórek i ostrożnie odrzucić supernatant zawierający pozostałości pożywki do zamrażania.
7. Delikatnie ponownie zawiesić osad komórek w 10 ml świeżego podłoża hodowlanego. W przypadku komórek przylegających, rozdzielić zawiesinę pomiędzy dwie kolby hodowlane T25; w przypadku hodowli zawieszonych, przenieść całą pożywkę do jednej kolby T25 w celu promowania skutecznej interakcji i wzrostu komórek.
8. Przestrzegaj ustalonych protokołów podhodowli w celu ciągłego wzrostu i utrzymania linii komórkowej, zapewniając wiarygodne wyniki eksperymentów.

### Incubation Atmosphere

$37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , nawilżona atmosfera.

### Flask Coating

Brak

### Freezing Procedure

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około  $-78^{\circ}\text{C}$  przez czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiolki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

## Komórki A375 | 300110

### Shipping Conditions

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiołki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

### Storage Conditions

W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiołki w ciekłym azocie w fazie lotnej w temperaturze od -150 do -196 °C. Przechowywanie w temperaturze -80 °C jest dopuszczalne tylko jako krótki etap przejściowy przed przeniesieniem do ciekłego azotu.

## Kontrola jakości / Profil genetyczny / HLA

### Sterility

Zanieczyszczenie mykoplazmą jest wykluczane przy użyciu zarówno testów opartych na PCR, jak i metod wykrywania mykoplazmy opartych na luminescencji.

Aby upewnić się, że nie ma zanieczyszczenia bakteriami, grzybami lub drożdżami, hodowle komórkowe są poddawane codziennym kontrolom wizualnym.

### Profil STR

**Amelogenin:** x,x  
**CSF1PO:** 11,12  
**D13S317:** 11,14  
**D16S539:** 9  
**D5S818:** 12  
**D7S820:** 9  
**TH01:** 8  
**TPOX:** 8,1

### Allele HLA

**A\*:** '01:01:01, '02:01:01  
**B\*:** '44:03:01, '57:01:01  
**C\*:** '06:02:01, '16:01:01  
**DRB1\*:** '04:05:01, '07:01:01  
**DQA1\*:** '02:01:01, '03:03:01  
**DQB1\*:** '03:02:01, '03:03:02  
**DPB1\*:** '04:01:01  
**E:** '01:01:01, '01:03