

A375-GFP | 305665

Informații generale

Description

A375-GFP este o variantă modificată genetic a liniei celulare A375 de melanom malign uman, care exprimă în mod stabil proteina fluorescentă verde îmbunătățită (eGFP). Linia celulară parentală A375 provine dintr-o tumoare de melanom cutanat la un pacient adult și este utilizată pe scară largă ca model pentru melanomul cutanat, în special pentru studii care implică semnalizarea oncogenică BRAF, deoarece prezintă mutația BRAF V600E. Această mutație duce la activarea constitutivă a căii MAPK/ERK, stimulând proliferarea și supraviețuirea, ceea ce face ca celulele A375 să fie extrem de relevante pentru investigarea terapilor țintite, cum ar fi inhibitorii BRAF și MEK. Derivatul care exprimă GFP păstrează aceste caracteristici moleculare și fenotipice, permițând în același timp aplicații bazate pe fluorescență.

Incorporarea stabilă a reporterului eGFP permite vizualizarea în timp real a celulelor A375-GFP atât în sisteme in vitro, cât și in vivo. Imagistica prin fluorescență facilitează monitorizarea proliferării, migrației, invaziei și modificărilor morfologice ale celulelor, precum și urmărirea creșterii tumorale și a diseminării metastatice în modele de xenogrefă. Varianta îmbunătățită de GFP oferă o luminozitate și o stabilitate sporite în comparație cu constructele GFP anterioare, permițând o detectare sensibilă chiar și la un număr redus de celule. Acest lucru face ca A375-GFP să fie deosebit de util în experimentele de cocultură, pe platformele de imagistică de înaltă rezoluție și în studiile care necesită o rezoluție spațială precisă a comportamentului celulelor tumorale.

A375-GFP păstrează fenotipul agresiv și proliferativ al liniei parentale de melanom, inclusiv reactivitatea la inhibitorii căii MAPK și capacitatea de invazie și metastazare în modelele experimentale. Adăugarea GFP extinde utilitatea sa pentru screeningul medicamentelor, imagistica celulelor vii și studiile privind interacțiunea dintre tumoră și micromediu. La fel ca în cazul altor linii celulare marcate cu reporter, se recomandă validarea stabilității și consistenței fluorescenței de-a lungul pasajelor pentru aplicații experimentale specifice.

Organism Om

Tissue Picior, piele

Disease Melanom amelanotic

Caracteristici

Age 54 de ani

Gender Femei

Ethnicity Caucazian

Growth properties Aderent

Date de reglementare

A375-GFP | 305665

Citation	A375-GFP (număr de catalog Cytion 305665)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_QZ67
GMO Status	GMO-S1: Această linie celulară de melanom uman A375 conține un construct de expresie GFP îmbunătățit, introdus prin intermediul unui vector lentiviral, pentru vizualizare fluorescentă. Această clasificare se aplică numai pe teritoriul Germaniei și poate diferi în alte țări.

Date biomoleculare

Antigen expression	ZsGreen1 (proteina fluorescentă verde)
Mutational profile	Mutație: BRAF, simplă, p.Val600Glu (c.1799T>A), homozigotă (provenită din linia celulară parentală). Mutație, CDKN2A, simplă, p.Glu61Ter (c.181G>T) (p.Gly75Val, c.224G>T), homozigotă (din linia celulară părinte). Mutație, CDKN2A, simplă, p.Glu69Ter (c.205G>T) (p.Gly83Val, c.248G>T), homozigotă (din linia celulară părinte). Mutație, TERT, simplă, c.1-146C>T (c.250C>T) (C250T), nespecificată, Notă = În promotor (din linia celulară părinte).

Manipulare

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/L glucoză, w: 4 mM L-glutamină, w: 3,7 g/L NaHCO ₃ , w: 1,0 mM piruvat de sodiu (număr articol Cytion 820300a)
Supplements	Suplimentați mediul cu 10% FBS
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Îndepărtați mediul vechi de pe celulele aderente și spălați-le cu PBS care nu conține calciu și magneziu. Pentru flacoanele T25, se utilizează 3-5 ml de PBS, iar pentru flacoanele T75, 5-10 ml. Apoi, se acoperă celulele complet cu Accutase, folosind 1-2 ml pentru flacoanele T25 și 2,5 ml pentru flacoanele T75. Lăsați celulele la incubare la temperatura camerei timp de 8-10 minute pentru a le detașa. După incubare, amestecați ușor celulele cu 10 ml de mediu pentru a le resuspenda, apoi centrifugați la 300xg timp de 3 minute. Aruncați supernatantul, resuspendați celulele în mediu proaspăt și transferați-le în flacoane noi care conțin deja mediu proaspăt.
Seeding density	1 până la 3×10^4 cel ^{ule} /cm ²
Fluid renewal	de 2 până la 3 ori pe săptămână

A375-GFP | 305665

Freeze medium

Ca mediu de crioconservare, folosim mediu de creștere complet + 10% DMSO pentru o viabilitate adecvată după dezghețare.

Thawing and Culturing Cells

1. Confirmați că flaconul rămâne profund înghețat la livrare, deoarece celulele sunt expediate pe gheață carbonică pentru a menține temperaturi optime în timpul transportului.
2. La primire, fie depozitați crioviola imediat la temperaturi sub -150 °C pentru a asigura păstrarea integrității celulare, fie treceți la etapa 3 dacă este necesară cultivarea imediată.
3. Pentru cultivarea imediată, dezghețați rapid flaconul prin scufundarea acestuia într-o baie de apă la 37 °C cu apă curată și un agent antimicrobian, agitându-l ușor timp de 40-60 de secunde până când rămâne o mică aglomerare de gheață.
4. Se efectuează toate etapele ulterioare în condiții sterile, într-o hotă cu flux, dezinfectând crioviola cu etanol 70% înainte de deschidere.
5. Se deschide cu grijă flaconul dezinfectat și se transferă suspensia celulară într-un tub de centrifugare de 15 ml care conține 8 ml de mediu de cultură la temperatura camerei, amestecând ușor.
6. Se centrifughează amestecul la 200 x g timp de 5 minute, se aruncă cu grijă supernatantul care conține mediul de congelare.
7. Se urmează procedura descrisă la secțiunea Recuperare după decongelare

Incubation Atmosphere

37°C, 5%_{CO2}, atmosferă umidificată.

Shipping Conditions

Liniile celulare crioconservate sunt expediate pe gheață carbonică în ambalaje izolate, validate, cu suficient agent frigorific pentru a menține aproximativ -78 °C pe toată durata transportului. La primire, se inspectează imediat recipientul și se transferă fără întârziere fiolele în depozitul corespunzător.

Storage Conditions

Pentru conservarea pe termen lung, flacoanele se plasează în azot lichid în fază de vapori la o temperatură cuprinsă între -150 și -196 °C. Păstrarea la -80 °C este acceptabilă doar ca o scurtă etapă intermediară înainte de transferul în azot lichid.

Controlul calității / Profil genetic / HLA