

A375-GFP | 305665

Všeobecné informácie

Description

A375-GFP je geneticky modifikovaná varianta ľudskej buneckej línie malígneho melanómu A375, ktorá stabilne exprimuje zvýraznený zelený fluorescenčný proteín (eGFP). Pôvodná bunková línia A375 pochádza z kožného melanómu dospelého pacienta a je široko používaná ako model kožného melanómu, najmä pre štúdie týkajúce sa onkogénnej BRAF signalizácie, keďže obsahuje mutáciu BRAF V600E. Táto mutácia vedie k konštitutívnej aktivácii signálnej dráhy MAPK/ERK, čo podporuje proliferáciu a prežívanie buniek, vďaka čomu sú bunky A375 veľmi vhodné na skúmanie cieľných terapií, ako sú inhibítory BRAF a MEK. Derivát exprimujúci GFP si zachováva tieto molekulárne a fenotypové charakteristiky a zároveň umožňuje aplikácie založené na fluorescencii.

Stabilná integrácia reportéra eGFP umožňuje vizualizáciu buniek A375-GFP v reálnom čase v systémoch in vitro aj in vivo. Fluorescenčné zobrazovanie uľahčuje monitorovanie proliferácie, migrácie, invázie a morfológických zmien buniek, ako aj sledovanie rastu nádoru a šírenia metastáz v modeloch s xenotransplantátmi. Vylepšená varianta GFP poskytuje vyššiu jasnosť a stabilitu v porovnaní s predchádzajúcimi konštruktmi GFP, čo umožňuje citlivú detekciu aj pri nízkom počte buniek. Vďaka tomu je A375-GFP obzvlášť užitočný v experimentoch s kokultúrami, na platformách zobrazovania s vysokým obsahom údajov a v štúdiách vyžadujúcich presné priestorové rozlíšenie správania nádorových buniek.

A375-GFP si zachováva agresívny a proliferatívny fenotyp pôvodnej línie melanómu, vrátane citlivosti na inhibítory MAPK dráhy a schopnosti invázie a metastázovania v experimentálnych modeloch. Pridanie GFP rozširuje jeho využiteľnosť pri skríningu liekov, zobrazovaní živých buniek a štúdiách interakcie nádoru s mikroprostredím. Rovnako ako v prípade iných bunkových línií označených reportérmi sa pre konkrétne experimentálne aplikácie odporúča overenie stability a konzistencie fluorescencie v priebehu pasáží.

Organism

Ľudské

Tissue

Noha, koža

Disease

Amelanotický melanóm

Charakteristika

Age

54 rokov

Gender

Ženy

Ethnicity

Kaukazský

Growth properties

Adherent

Regulačné údaje

A375-GFP | 305665

Citation	A375-GFP (katalógové číslo Cytion 305665)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_QZ67
GMO Status	GMO-S1: Táto ľudská melanómová bunka A375 obsahuje konštrukt so zvýšenou expresiou GFP, ktorý je do bunky zavedený prostredníctvom lentivírusového vektora na účely fluorescenčnej vizualizácie. Táto klasifikácia platí iba v Nemecku a v iných krajinách sa môže líšiť.

Biomolekulárne údaje

Antigen expression	ZsGreen1 (zelený fluorescenčný proteín)
Mutational profile	Mutácia: BRAF, jednoduchá, p.Val600Glu (c.1799T>A), homozygotná (z rodičovskej bunky). Mutácia, CDKN2A, jednoduchá, p.Glu61Ter (c.181G>T) (p.Gly75Val, c.224G>T), homozygotná (z rodičovskej bunky). Mutácia, CDKN2A, jednoduchá, p.Glu69Ter (c.205G>T) (p.Gly83Val, c.248G>T), homozygotná (z rodičovskej bunky). Mutácia, TERT, jednoduchá, c.1-146C>T (c.250C>T) (C250T), nešpecifikovaná, poznámka = v promotore (z rodičovskej bunky).

Spracovanie

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/l glukózy, w: 4 mM L-glutamínu, w: 3,7 g/l NaHCO ₃ , w: 1,0 mM pyruvátu sodného (číslo výrobku Cytion 820300a)
Supplements	Doplňte médium o 10 % FBS
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Odstráňte staré médium z adherovaných buniek a premyte ich PBS, ktorý neobsahuje vápnik a horčík. Pre banky T25 použite 3 - 5 ml PBS a pre banky T75 použite 5 - 10 ml. Potom bunky úplne pokryte Accutase, pričom použite 1 - 2 ml pre banky T25 a 2,5 ml pre banky T75. Nechajte bunky inkubovať pri izbovej teplote 8-10 minút, aby sa oddelili. Po inkubácii jemne premiešajte bunky s 10 ml média, aby boli znovu suspendované, a potom ich 3 minúty odstredíte pri 300xg. Supernatant zlikvidujte, bunky znovu rozmiešajte v čerstvom médiu a preneste ich do nových fliaš, ktoré už obsahujú čerstvé médium.
Seeding density	1 až 3 x 10 ⁴ buniek/cm ²

A375-GFP | 305665

Fluid renewal 2 až 3-krát týždenne

Freeze medium Ako médium na kryokonzerváciu používame kompletne rastové médium + 10 % DMSO na zabezpečenie primeranej životaschopnosti po rozmrazení.

Thawing and Culturing Cells

1. Overte si, že injekčná liekovka zostane pri doručení hlboko zmrazená, pretože bunky sa prepravujú na suchom ľade, aby sa počas prepravy udržala optimálna teplota.
2. Po prijatí buď okamžite uskladnite kryovialku pri teplote nižšej ako -150 °C, aby ste zabezpečili zachovanie bunkovej integrity, alebo prejdite na krok 3, ak je potrebná okamžitá kultivácia.
3. V prípade okamžitej kultivácie injekčnú liekovku rýchlo rozmrazte ponorením do vodného kúpeľa s teplotou 37 °C s čistou vodou a antimikrobiálnym prostriedkom, pričom ju jemne miešajte 40 - 60 sekúnd, kým nezostane malý ľadový chumáč.
4. Všetky ďalšie kroky vykonajte v sterilných podmienkach v prietokovom digestore a pred otvorením kryovialku dezinfikujte 70 % etanolom.
5. Opatrne otvorte dezinfikovanú fľaštičku a preneste bunkovú suspenziu do 15 ml centrifugačnej skúmavky obsahujúcej 8 ml kultivačného média s izbovou teplotou a jemne premiešajte.
6. Zmes odstreďte pri 200 x g počas 5 minút, supernatant obsahujúci zmrazovacie médium opatrne zlikvidujte.
7. Postupujte podľa postupu opísaného v časti Obnova po rozmrazení

Incubation Atmosphere 37 °C, 5 % CO_2 , zvlhčená atmosféra.

Shipping Conditions

Kryokonzervované bunkové línie sa prepravujú na suchom ľade v overených, izolovaných obaloch s dostatočným množstvom chladiva na udržanie teploty približne -78 °C počas celej prepravy. Po prijatí ihneď skontrolujte obal a bezodkladne premiestnite injekčné liekovky do vhodného skladu.

Storage Conditions

Na dlhodobé uchovávanie umiestnite injekčné liekovky do kvapalnej fázy dusíka v pare pri teplote približne -150 až -196 °C. Skladovanie pri teplote -80 °C je prijateľné len ako krátky prechodný krok pred presunom do tekutého dusíka.

Kontrola kvality / Genetický profil / HLA