

A375-GFP | 305665

Splošne informacije

Description

A375-GFP je gensko spremenjena različica človeške celične linije malignega melanoma A375, ki stabilno izraža okrepljen zeleni fluorescenčni protein (eGFP). Izvorna celična linija A375 izhaja iz kožnega melanomskega tumorja pri odraslem pacientu in se pogosto uporablja kot model za kožni melanom, zlasti za študije, ki vključujejo onkogeno signalizacijo BRAF, saj vsebuje mutacijo BRAF V600E. Ta mutacija vodi do konstitutivne aktivacije poti MAPK/ERK, kar spodbuja proliferacijo in preživetje ter zaradi česar so celice A375 zelo pomembne za raziskovanje ciljnih terapij, kot so zaviralci BRAF in MEK. Derivata, ki izraža GFP, ohranja te molekularne in fenotipne značilnosti, hkrati pa omogoča uporabo na podlagi fluorescenčnega slikanja.

Stabilna vgradnja eGFP-reporterja omogoča vizualizacijo celic A375-GFP v realnem času tako v sistemih in vitro kot tudi in vivo. Fluorescenčno slikanje olajšuje spremljanje celične proliferacije, migracije, invazije in morfoloških sprememb ter sledenje rasti tumorja in metastaziranja v modelih ksenotransplantatov. Izboljšana različica GFP zagotavlja večjo svetlost in stabilnost v primerjavi s prejšnjimi GFP-konstrukti, kar omogoča občutljivo zaznavanje tudi pri majhnem številu celic. Zaradi tega je A375-GFP še posebej uporaben v poskusih s kokulturo, na platformah za visokokakovostno slikanje ter v študijah, ki zahtevajo natančno prostorsko ločljivost pri opazovanju vedenja tumorskih celic.

A375-GFP ohranja agresiven in proliferativni fenotip izvorne linije melanoma, vključno z odzivnostjo na zaviralce MAPK-poti ter zmožnostjo invazije in metastaziranja v eksperimentalnih modelih. Dodatek GFP razširja njegovo uporabnost za presejanje zdravil, slikanje živih celic in študije interakcij med tumorjem in mikrookoljem. Tako kot pri drugih celičnih linijah, označenih z reporterjem, se za določene eksperimentalne namene priporoča preverjanje stabilnosti in doslednosti fluorescenčnega signala med posameznimi pasážami.

Organism

Človek

Tissue

Noga, koža

Disease

Amelanotični melanom

Značilnosti

Age

54 let

Gender

Ženske

Ethnicity

Kavkaški

Growth properties

Pripadajoče

Regulativni podatki

A375-GFP | 305665

Citation	A375-GFP (kataloška številka Cytion 305665)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_QZ67
GMO Status	GMO-S1: Ta človeška linija melanoma A375 vsebuje konstrukt za povečano izražanje GFP, ki ga prenaša lentiviralni vektor za fluorescenčno vizualizacijo. Ta klasifikacija velja le v Nemčiji in se drugod lahko razlikuje.

Biomolekularni podatki

Antigen expression	ZsGreen1 (zeleni fluorescenčni protein)
Mutational profile	Mutacija: BRAF, enostavna, p.Val600Glu (c.1799T>A), homozigotna (iz izvorne celične linije).Mutacija, CDKN2A, preprosta, p.Glu61Ter (c.181G>T) (p.Gly75Val, c.224G>T), homozigotna (iz starševske celične linije).Mutacija, CDKN2A, preprosta, p.Glu69Ter (c.205G>T) (p.Gly83Val, c.248G>T), homozigotna (iz starševske celične linije).Mutacija, TERT, preprosta, c.1-146C>T (c.250C>T) (C250T), nedoločena, opomba = v promotorju (iz starševske celične linije).

Ravnanje s spletno stranjo

Culture Medium	DMEM, w: 4,5 g/L glukoze, w: 4 mM L-glutamina, w: 3,7 g/L NaHCO ₃ , w: 1,0 mM natrijevega piruvata (številka izdelka Cytion 820300a)
Supplements	Gojišče dopolnite z 10 % FBS
Dissociation Reagent	Accutase
Subculturing	Odstranite staro gojišče z adherentnih celic in jih sperite s PBS, ki ne vsebuje kalcija in magnezija. Za bučke T25 uporabite 3-5 ml PBS, za bučke T75 pa 5-10 ml. Nato celice popolnoma prekrijte z Accutase, pri čemer uporabite 1-2 ml za bučke T25 in 2,5 ml za bučke T75. Celice pustite inkubirati pri sobni temperaturi 8-10 minut, da se ločijo. Po inkubaciji celice nežno premešajte z 10 ml gojišča, da se ponovno suspendirajo, nato jih 3 minute centrifugirajte pri 300xg. Zavrzite supernatant, ponovno suspendirajte celice v svežem gojišču in jih prenesite v nove bučke, ki že vsebujejo sveže gojišče.
Seeding density	1 do 3 x 10 ⁴ celic/cm ²

A375-GFP | 305665

Fluid renewal 2 do 3-krat na teden

Freeze medium Kot gojišče za krioprezervacijo uporabljamo popolno rastno gojišče + 10 % DMSO za ustrezno vitalnost po odmrznitvi.

Thawing and Culturing Cells

1. Prepričajte se, da je viala ob dostavi globoko zamrznjena, saj se celice pošiljajo na suhem ledu, da se med prevozom ohranijo optimalne temperature.
2. Po prejemu kriovial takoj shranite pri temperaturi pod $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, da zagotovite ohranitev celične celovitosti, ali pa nadaljujte s korakom 3, če je potrebno takojšnje gojenje.
3. Za takojšnje gojenje vialo hitro odtalite tako, da jo potopite v vodno kopel s čisto vodo in protimikrobnim sredstvom pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter 40-60 sekund nežno mešate, dokler ne ostane majhen ledeni kepica.
4. Vse nadaljnje korake izvajajte v sterilnih pogojih v pretočni nape, pred odprtjem pa kriovial razkužite s 70 % etanolom.
5. Previdno odprite razkuženo vialo in celično suspenzijo prenesite v 15-mililitrsko centrifugirno epruveto, ki vsebuje 8 ml gojišča sobne temperature, ter nežno premešajte.
6. Mešanico centrifugirajte pri $200 \times g$ 5 minut, supernatant, ki vsebuje gojišče za zamrzovanje, previdno zavržite.
7. Izvedite postopek, opisan v poglavju Obnova po odmrzovanju

Incubation Atmosphere $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 , vlažno ozračje.

Shipping Conditions Kriokonzervirane celične linije se pošiljajo na suhem ledu v potrjeni, izolirani embalaži z zadostno količino hladilnega sredstva, da se med prevozom vzdržuje približno $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ob prejemu takoj preglejte embalažo in viale nemudoma prenesite v ustrezno skladišče.

Storage Conditions Za dolgotrajno shranjevanje vialo postavite v tekoči dušik v parni fazi pri približno -150 do $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Shranjevanje pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ je sprejemljivo le kot kratek vmesni korak pred prenosom v tekoči dušik.

Nadzor kakovosti / Genetski profil / HLA