Product sheet

A375-GFP | 305665

Загальна інформація

Description	A375-GFP — це генетично модифікований варіант клітинної лінії A375, що походить від злоякісної меланоми людини, який стабільно експресує посилений зелений флуоресцентний білок (eGFP). Базова клітинна лінія A375 походить від пухлини меланоми шкіри дорослого пацієнта і широко використовується як модель шкірної меланоми, зокрема для досліджень, пов'язаних з онкогенним сигнальним шляхом BRAF, оскільки вона містить мутацію BRAF V600E. Ця мутація призводить до постійної активації сигнального шляху MAPK/ERK, що стимулює проліферацію та виживання клітин, завдяки чому клітини A375 є надзвичайно актуальними для дослідження цільових терапій, таких як інгібітори BRAF та MEK. Похідна лінія, що експресує GFP, зберігає ці молекулярні та фенотипні характеристики, водночас забезпечуючи можливість застосування методів на основі флуоресценції. Стабільне вбудовування репортера eGFP дозволяє візуалізувати клітини A375-GFP у реальному часі як в системах in vitro, так і in vivo. Флуоресцентна візуалізація полегшує моніторинг проліферації, міграції, інвазії та морфологічних змін клітин, а також відстеження росту пухлини та метастатичного поширення в моделях ксенотрансплантатів. Посилений варіант GFP забезпечує кращу яскравість та стабільність порівняно з попередніми конструкціями GFP, що дозволяє здійснювати чутливе виявлення навіть при невеликій кількості клітин. Це робить A375-GFP особливо корисним у експериментах із кокультурою, на платформах візуалізації з високою інформаційною насиченістю та в дослідженнях, що вимагають точної просторової роздільної здатності для вивчення поведінки пухлинних клітин. A375-GFP зберігає агресивний та проліферативний фенотип батьківської лінії меланоми, включаючи чутливість до інгібіторів шляху MAPK та здатність до інвазії та метастазування в експериментальних моделях. Додавання GFP розширює можливості її використання для скринінгу лікарських засобів, візуалізації живих клітин та досліджень взаємодії пухлини з мікросередовищем. Як і у випадку з іншими клітинними лініями, міченими репортерами, для конкретних експериментальних застосувань рекомендується перевірити стабільність та сталість флуоресценції протягом пасажів. **Генетична модифікація:** Стабільно модифікована шляхом реплікаційно-некомпетентної лентивірусної трансдукції для експресії репортера — зеленого флуоресцентного білка ZsGreen1; утримується як поліклональна популяція під селекцією пуроміцином (1–5 мкг/мл). Рівень біобезпеки S1/BSL-1.
Organism	Людина
Tissue	Нога, шкіра
Disease	Амеланотична меланома

Характеристики

Age	54 роки
Gender	Жінка
Ethnicity	Кавказець

A375-GFP | 305665

Growth properties	Адепт

Нормативні дані

Citation	A375-GFP (номер у каталозі Cytion 305665)
Biosafety level	1
NCBI_TaxID	9606
CellosaurusAccession	CVCL_QZ67
GMO Status	GMO-S1: Ця клітинна лінія містить стабільно інтегрований репортерний зелений флуоресцентний білок ZsGreen1, введений за допомогою реплікаційно-некомпетентної лентивірусної трансдукції. Отриману поліклональну клітинну популяцію підтримували в умовах селекції пуроміцином (1–5 мкг/мл). Необхідний рівень біобезпеки S1. Ця класифікація діє лише на території Німеччини і може відрізнятися в інших країнах.

Біомолекулярні дані

Antigen expression	ZsGreen1 (зелений флуоресцентний білок)
Mutational profile	Мутація: BRAF, проста, p.Val600Glu (c.1799T>A), гомозиготна (з батьківської клітинної лінії).Мутація, CDKN2A, проста, p.Glu61Ter (c.181G>T) (p.Gly75Val, c.224G>T), гомозиготна (від батьківської клітинної лінії).Мутація, CDKN2A, проста, p.Glu69Ter (c.205G>T) (p.Gly83Val, c.248G>T), гомозиготна (від батьківської клітинної лінії).Мутація, TERT, проста, c.1-146C>T (c.250C>T) (C250T), неспецифікована, примітка = у промоторі (від батьківської клітинної лінії).

Обробка

Culture Medium	ДМЕМ, w: 4,5 г/л Глюкоза, w: 4 мМ L-глутамін, w: 3,7 г/л NaHCO3, w: 1,0 мМ піруват натрію (цит. номер 820300a)
Supplements	Додайте до середовища 10% FBS
Dissociation Reagent	Аккутаза

A375-GFP | 305665

Subculturing	Видаліть старе середовище з прилиплих клітин і промийте їх PBS, в якому бракує кальцію і магнію. Для колб T25 використовуйте 3-5 мл PBS, а для колб T75 - 5-10 мл. Потім повністю покрийте клітини аккутазою, використовуючи 1-2 мл для колб T25 і 2,5 мл для колб T75. Залиште клітини інкубуватися при кімнатній температурі протягом 8-10 хвилин, щоб відокремити їх. Після інкубації обережно змішайте клітини з 10 мл середовища, щоб ресуспендувати їх, а потім центрифугуйте при 300xg протягом 3 хвилин. Викиньте надосадову рідину, ресуспендуйте клітини у свіжому середовищі та перенесіть їх у нові колби, які вже містять свіже середовище.
Seeding density	Від 1 до 3 x 10^4 клітин/^{см2}
Fluid renewal	2-3 рази на тиждень
Freeze medium	В якості середовища для кріоконсервування ми використовуємо повне живильне середовище + 10% ДМСО для адекватної життєздатності після розморожування.
Thawing and Culturing Cells	1. Переконайтеся, що віал залишається глибоко замороженим після доставки, оскільки клітини транспортуються на сухому льоду для підтримання оптимальної температури під час транспортування. 2. Після отримання негайно зберігайте кріовіал при температурі нижче -150°C, щоб забезпечити збереження клітинної цілісності, або перейдіть до кроку 3, якщо потрібне негайне культивування. 3. Для негайного культивування швидко розморозьте віал, зануривши його у водяну баню з чистою водою і антимікробним засобом при температурі 37°C, обережно перемішуючи протягом 40-60 секунд, поки не залишиться невелика крижана грудка. 4. Всі наступні кроки виконуйте в стерильних умовах у проточній витяжній шафі, дезінфікуючи кріовіал 70% етанолом перед відкриттям. 5. Обережно відкрийте продезінфікований флакон і перенесіть клітинну суспензію в 15 мл центрифужну пробірку, що містить 8 мл культурального середовища кімнатної температури, обережно перемішуючи. 6. Центрифугуйте суміш при 200 x g протягом 5 хвилин, обережно відкиньте надосадову рідину, що містить заморожувальне середовище. 7. Виконайте процедуру, описану в розділі Відновлення після відтавання
Incubation Atmosphere	37°C, 5% $_{CO2}$, волога атмосфера.

Shipping Conditions	Кріоконсервовані клітинні лінії транспортуються на сухому льоду в перевіреній ізольованій упаковці з достатньою кількістю холодоагенту для підтримання температури приблизно -78 °C під час транспортування. При отриманні негайно огляньте контейнер і без зволікань перемістіть флакони у відповідне місце зберігання.
Storage Conditions	Для тривалого зберігання помістіть флакони в парофазний рідкий азот при температурі від -150 до -196 °C. Зберігання при -80 °C допустиме лише як короткий проміжний етап перед перенесенням у рідкий азот.

Контроль якості та молекулярний аналіз