

# **AKT1 E17K/BaF3**

# **CBP73275**

# **操作说明书**



4008-750-250

## 目录

1. 背景信息 .....	1
2. 产品介绍 .....	1
3. 细胞基本信息 .....	2
4. 主要仪器试剂耗材 .....	2
5. 细胞培养 .....	3
5.1 细胞复苏 .....	3
5.2 细胞传代 .....	3
5.3 细胞冻存 .....	3
6. 细胞实验流程 .....	3
6.1 Anti-proliferation Assay .....	3
7. 数据展示 .....	5
7.1 增殖抑制实验验证结果 .....	5
7.2 WB 验证结果 .....	5
7.3 Sanger 测序验证结果 .....	6
8. 相关产品 .....	6

## 1. 背景信息

AKT 也被称为蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB), 是一种分子量约为 60kDa 的丝/苏氨酸蛋白激酶, 其主要具有 3 个结构域: PH 结构域 (对 PIP3 有亲和力, 因此对于和胞膜的结合至关重要); 催化结构域; 调节结构域。哺乳动物中 AKT 有 3 种主要的异构体: Akt1, 2, 3。AKT1 (v-Akt) 最初是作为原癌基因发现的, 在调节各种细胞功能 (包括代谢、生长、增殖、存活、转录和蛋白质合成) 中起关键作用。AKT1 基因(亦称为 AKT)编码一种丝苏氨酸特异性蛋白激酶, 通过其丝苏氨酸激酶活性介导 PI3K 信号传导途径, 上游信号途径为 EGFR 信号途径, 参与细胞活力和增殖的控制, 抑制细胞凋亡和促进细胞周期进展。AKT1 激酶主要磷酸化位点为 T308(PDK1 磷酸化位点) 和 S473 (mTOR 和 DNA-PK 磷酸化位点)。AKT1 参与的 PI3K-AKT 信号途径的组成型激活发生于乳腺癌、非小细胞肺癌、胃癌、胃肠道间质瘤等多种癌症中, 其过度激活由 AKT1 基因扩增或激活突变引起。AKT1 基因 E71K 突变激活其激酶活性, 刺激下游信号传导, 引发肿瘤细胞的转化, 与乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌等发生相关; 该突变也出现在肺鳞癌和前列腺癌中。胃腺癌、肺癌、乳腺癌等多种癌症中与 AKT1 基因的扩增和杂合缺失相关。

## 2. 产品介绍

科佰生物推出 AKT1 E17K/BaF3 药靶细胞, 其通过慢病毒转染的方法引入 E17K 突变状态的 AKT1 基因到 BaF3 细胞系中, 稳定表达人突变形态下 AKT1 E17K 基因。

Ba/F3 (小鼠原 B 细胞) 的生长和增殖需要 IL-3 的维持。引入各种表达激酶基因, 这些基因能作为 Ba/F3 的驱动基因, 让 Ba/F3 不再依赖 IL-3 而增殖, 进而激酶基因成为 Ba/F3 增殖依赖的驱动基因, 用于评估小分子药物对激酶的靶向抑制作用。

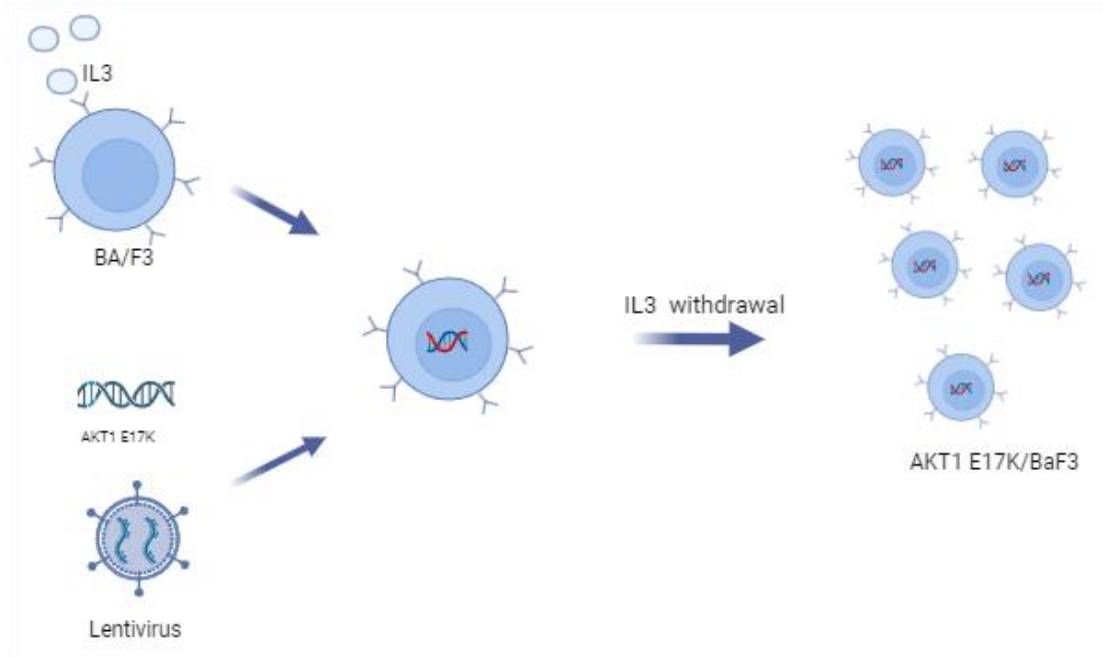


图 1: AKT1 E17K/BaF3 细胞构建流程

### 3. 细胞基本信息

母细胞: Ba/F3

表达基因: AKT1 E17K

传代培养基: RPMI-1640+10%FBS

细胞冻存液: 90% FBS+10% DMSO

细胞形态: 悬浮

支原体检测: 阴性

稳定性: 16 代（室内测试结果，不表示超过 16 代以上不稳定）

保存条件: 液氮保存

### 4. 主要仪器试剂耗材

名称	品牌	货号
AKT1 E17K/BaF3 完全培养基	Cobioer	CBP73275M
细胞冻存液	Cobioer	CBP50089
96 Well Assay Plate (White Plate, Clear Bottom with Lid Tissue Culture Treated Polystyrene 1/Pack)	Costar	3610

细胞活力检测试剂盒	Cobioer	CBPH0004
-----------	---------	----------

## 5. 细胞培养

### 5.1 细胞复苏

- 1) 在 37°C 水浴中快速融化细胞约 60 秒。一旦细胞解冻（可能比 60 秒稍快或稍慢），快速将冻存管中的细胞吸入装有 10 ml 预热 AKT1 E17K/BaF3 完全培养基的 15 ml 离心管中。
- 2) 1000 转、5 分钟离心细胞，除去培养基并将细胞重悬于 5 ml 预热的完全培养基中。
- 3) 调整细胞密度到  $3-6 \times 10^5$  cells/ml，加入 T25 培养瓶中，放入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。

### 5.2 细胞传代

每 1-2 天取细胞悬液计数，当密度大于  $2 \times 10^6$  cells/ml 时,请及时传代或补加新鲜完全培养基。保持细胞密度在  $3 \times 10^5 - 2 \times 10^6$  cells/ml 之间。

### 5.3 细胞冻存

取  $8 \times 10^6$  细胞离心后弃上清。加 1ml 细胞冻存液(90% FBS+10%DMSO)，吹打均匀，加入细胞冻存管。立即放入细胞冻存盒（Nalgene 5100-0001），加异丙醇到刻度线，放-80°C 冰箱。24 小时后将冻存管转到液氮中长期保存。

## 6. 细胞实验流程

### 6.1 Anti-proliferation Assay

此实验由药靶细胞 AKT1 E17K /BaF3 细胞,Cat. # CBP73275 开展，本实验使用 AZD5363、ARQ-092、MK-2206 为测试样本，验证本模型的生物功能。

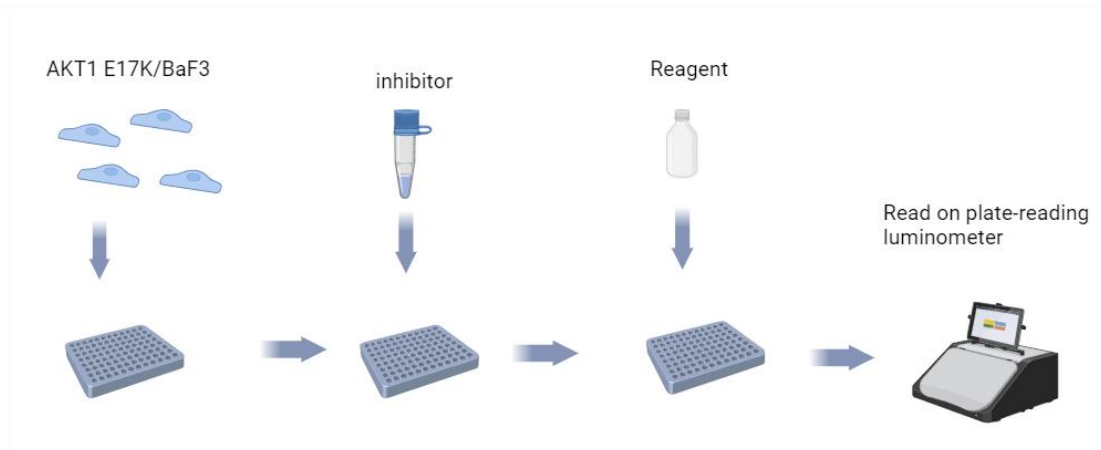


图 2: AKT1 E17K/BaF3 增殖抑制实验流程示意图

- 1) 取对数生长的细胞，离心弃培养上清，将离心下来的细胞重悬于新鲜 RPMI1640 培养基中，细胞密度为  $5 \times 10^4$ /ml。
- 2) 将重悬的细胞接种到白壁透明底的 96 孔细胞培养板中，100ul/孔细胞悬液，接种两块培养板，放置 37 度细胞培养箱 4 小时。
- 3) 取出其中一块接种细胞的 96 孔板，加入 100ul/孔细胞活力检测试剂放置 30 分钟，读取数值，定义为 G0 数据。
- 4) 取另一块平行板，加入梯度稀释的 10\*浓度化合物 11.1 ul/孔，化合物从 10uM (96 孔板内 1\*最终浓度) 开始，3 倍稀释 9 个浓度梯度，并另外设置 DMSO 对照孔，继续在 37°C 细胞培养箱培养 72 小时。
- 5) 将化合物处理过 72 小时的 96 孔板从培养箱中取出，加入 100ul/孔细胞活力检测试剂放置 30 分钟，读取数值，定义为 G3 数据。
- 6) 根据以下公式计算每个孔对应的细胞增殖率：
$$\text{Proliferation\%} = \frac{(\text{待测化合物孔 G3} - \text{G0 平均值})}{(\text{DMSO 对照孔 G3 平均值} - \text{G0 平均值})} * 100$$
。
- 7) 根据每个梯度浓度孔对应的增殖率和其浓度，利用 Prism Graphpad 软件拟合细胞增殖的梯度曲线，并且计算化合物的 GI50 (GI50 定义为细胞增殖率为 50%时对应的化合物浓度)。

## 7. 数据展示

### 7.1 增殖抑制实验验证结果

CTG Proliferation Assay of BaF3 AKT1 E17K Cells (C3)

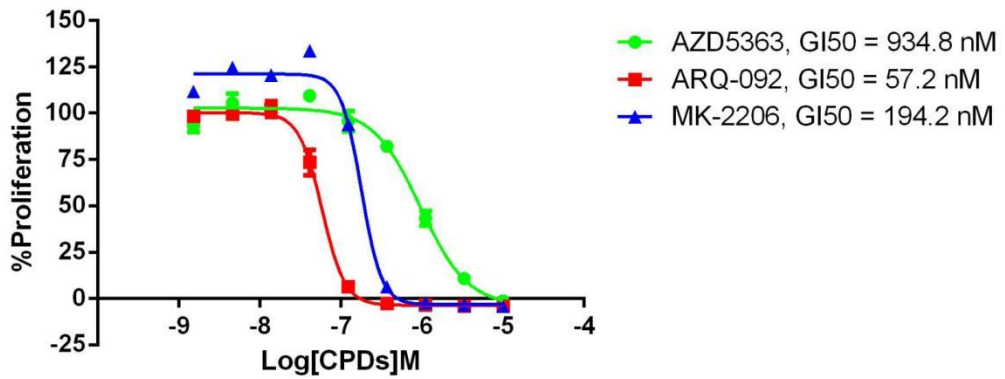


图 3: 使用 AZD5363、ARQ-092、MK-2206 增殖抑制实验结果

### 7.2 WB 验证结果

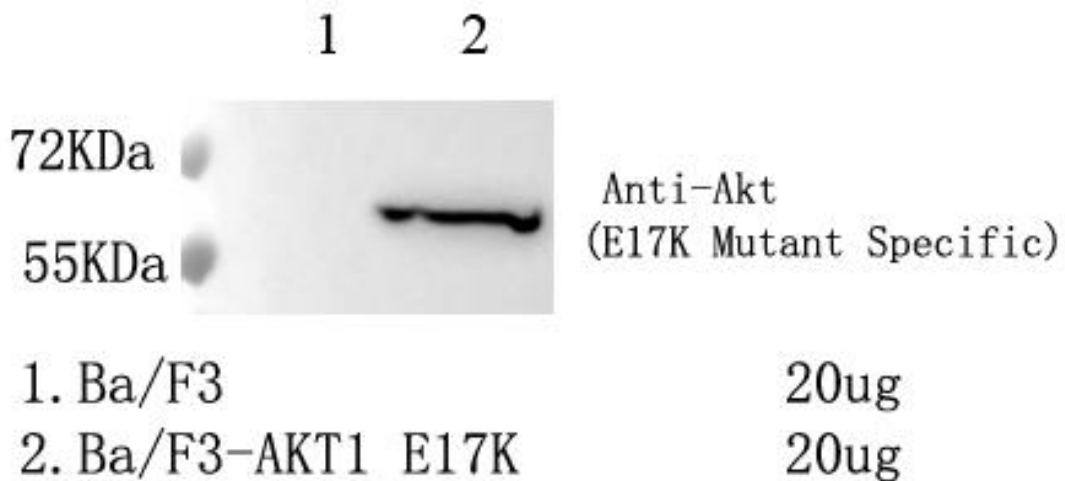


图 4: WB of AKT1 E17K/BaF3

## 7.3 Sanger 测序验证结果

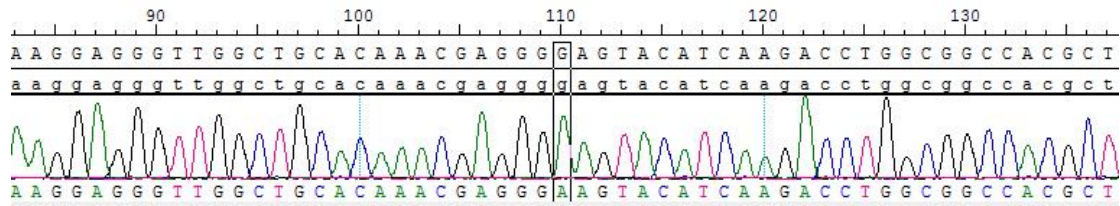


图 5：一代测序验证基因突变（AKT1 E17K/BaF3）

## 8. 相关产品

AKT1 WT/BaF3	CBP73295
AKT1 E17K/BaF3	CBP73275
AKT2 E17K/BaF3	CBP73281
AKT3 E17K/BaF3	CBP73280