BCR-ABL1 [Y253H/ E255K]/BaF3

CBP73326

操作说明书

4008-750-250

For Research Use Only

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 4
    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

BCR-ABL1 融合基因是一种抗细胞凋亡的基因，这种基因融合在慢性粒细胞白血病（CML）和某些急性淋巴细胞白血病（ALL）患者中很常见。ABL（Abelson）基因通常位于 9 号染色体上，BCR（Breakpoint Cluster Region）基因通常位于 22 号染色体上。其中包含 c-ABL 原癌基因的染色体易发生断裂，当这个片段移到 22 号染色体上时，ABL 基因的一部分附着在 BCR 基因上，合并后的基因称为 BCR-ABL 融合基因。由于研究人员首先在费城发现了这种融合基因的染色体，因此它也称为费城染色体。 根据 BCR 基因的断裂位点不同，可分为主要断裂点簇集区（major，M-BCR，E13A2 或 E14A2，编码 p210）、次要断裂点簇集区（minor，m-BCR，E1A2， 编码 p190）、微小断裂点簇集区（micro，μ-BCR， E19A2，编码 p230）。大多数 CML 表达 p210；极少数表达 p230，其化疗敏感性较低；约 2/3 的 Ph+ ALL 表达 p190。这种基因重组的产物是 BCR-ABL 酪氨酸激酶，它会持续激活 JAK2-STAT,PI3K-AKT，RAS-MAPK 等信号通路，导致不受控制的细胞存活与增殖，是造成 CML 的重要原因。由于 BCR-ABL 融合基因高度不稳定性，极易发生基因突变，突变后的基因是产生耐药性主要原因之一。根据 ABL 的晶体结构，可以将突变大致划主要分为 4 种类型：①P 环突变（位点 248-255）；②伊马替尼结合位置突变（T315/F317）；③催化结构域内突变（位点 350-363）；④活化环（A-loop）突变（位点 381-402）。

2. 产品介绍

科佰生物推出 BCR-ABL1 [Y253H/E255K]/BaF3 药靶细胞，其通过慢病毒转染的方法引入 Y253H/E255K 两种突变状态的 BCR-ABL1 基因到 BaF3 细胞系中，稳定表达人突变形态下的 BCR-ABL1 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。

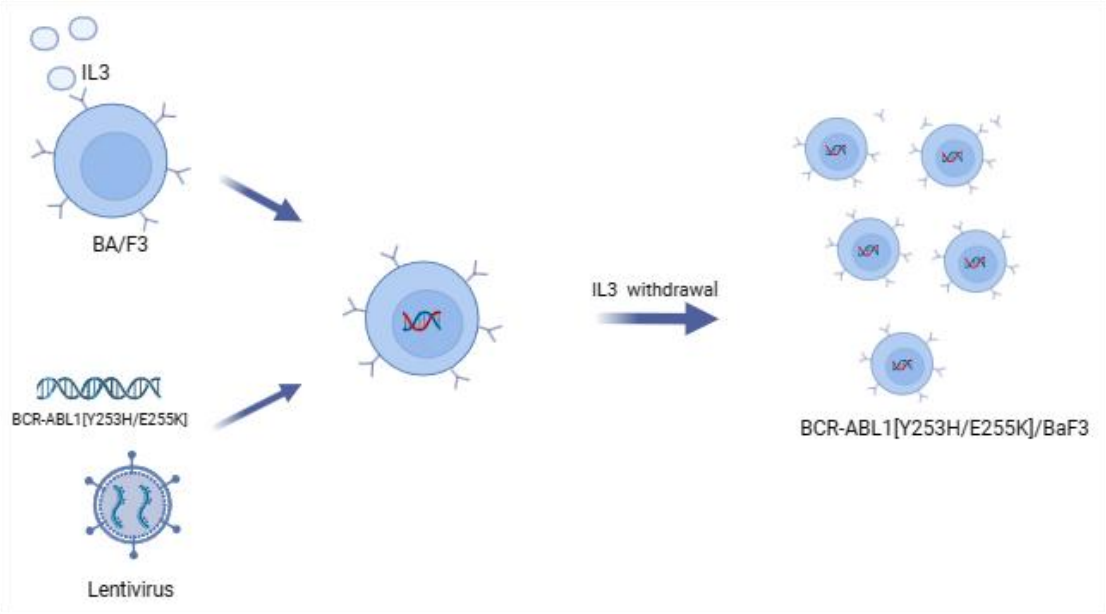


图 1: BCR-ABL1 [Y253H/E255K]/BaF3 细胞构建流程

3. 细胞基本信息

母细胞: Ba/F3

表达基因: BCR-ABL1 [Y253H/E255K]

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
BCR-ABL1 [Y253H/E255K]/BaF3 完全培养基	Cobioer	CBP73326M
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 BCR-ABL1 [Y253H/E255K]/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 x 10^5 cells/ml，加入 T25 培养瓶中，放入 37°C、5% CO2 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 2x 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 3x 10^5 - 2x 10^6 cells/ml 之间。

5.3 细胞冻存

取 8x106 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 BCR-ABL1 [Y253H/E255K] /BaF3 细胞,Cat. # CBP73326 开展，本实验使用 Cabozantinib、Dasatinib、Ponatinib 为测试样本，验证本模型的生物功能。

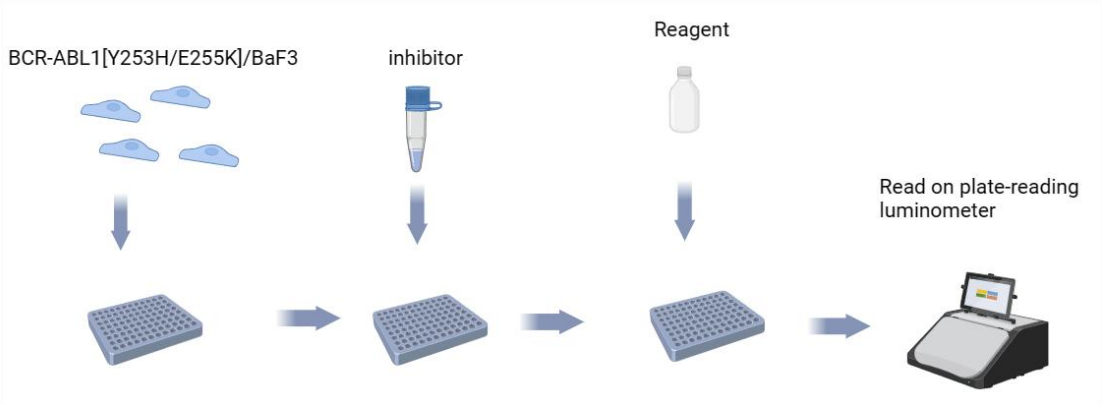


图 2: BCR-ABL1 [Y253H/E255K]/BaF3 增殖抑制实验流程示意图

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 $5x10^4$/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：Proliferation %=（待测化合物孔 G3 － G0 平均值）/（DMSO 对照孔 G3 平均值 － 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

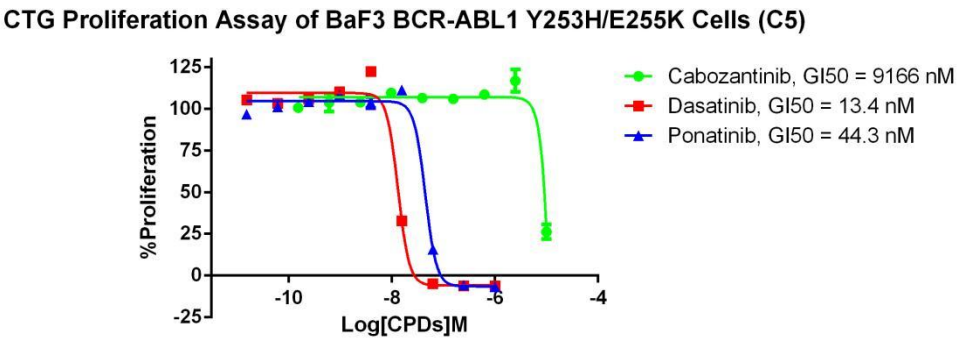
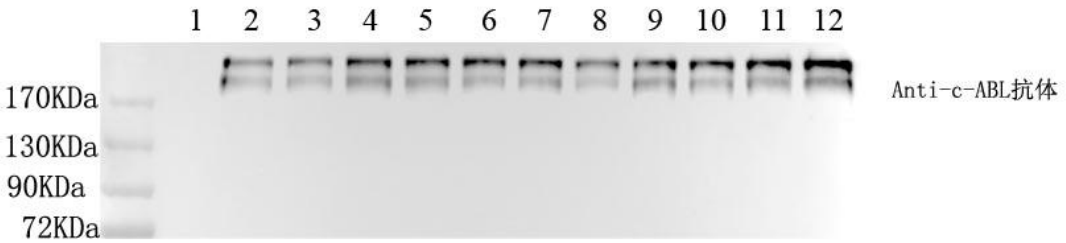


图 3：使用 Cabozantinib、Dasatinib、Ponatinib 增殖抑制实验结果

7.2 WB 验证结果



1. Ba/F3	20ug
2. Ba/F3-BCR-ABL1-T315M	20ug
3. Ba/F3-BCR-ABL1-F359V-T315I	20ug
4. Ba/F3-BCR-ABL1-F317L	20ug
5. Ba/F3-BCR-ABL1-F317L-T315I	20ug
6. Ba/F3-BCR-ABL1-H396P	20ug
7. Ba/F3-BCR-ABL1-Y253H-E255K	20ug
8 Ba/F3-BCR-ABL1-Y253H-F359V	20ug
9. Ba/F3-BCR-ABL1-E255K	20ug
10. Ba/F3-BCR-ABL1-V299L	20ug
11. Ba/F3-BCR-ABL1-M351T	20ug
12. Ba/F3-BCR-ABL1-G250E	20ug

图 4： WB of BCR-ABL1 [Y253H/E255K]/BaF3 Expression

7.3 Sanger 测序验证结果

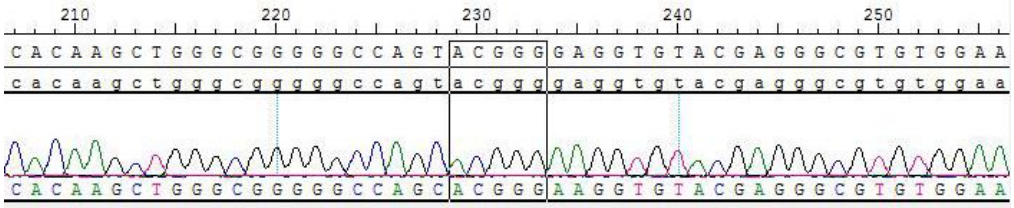


图 5：一代测序验证基因突变（Y253H/E255K）

8. 相关产品

名称	货号
BCR-ABL1/BaF3	CBP73001
BCR-ABL1 [T315I]/BaF3	CBP73190
BCR-ABL1 [E255V /T315I]/BaF3	CBP73277
BCR-ABL1[Q252H/T315I]/BaF3	CBP73278
BCR-ABL1 [E255K]/BaF3	CBP73318
BCR-ABL1 [E255V]/BaF3	CBP73288
BCR-ABL1 [E459K]/BaF3	CBP73302
BCR-ABL1 [F317L]/BaF3	CBP73329
BCR-ABL1 [F317L/T315I]/BaF3	CBP73325
BCR-ABL1 [F359V]/BaF3	CBP73303
BCR-ABL1 [F359V/T315I]/BaF3	CBP73327
BCR-ABL1 [G250E]/BaF3	CBP73321
BCR-ABL1 [H396P]/BaF3	CBP73317
BCR-ABL1 [P465S]/BaF3	CBP73304
BCR-ABL1 [Q252H]/BaF3	CBP73289
BCR-ABL1 [Y253H]/BaF3	CBP73287
BCR-ABL1[Y253H/E255K]/BaF3	CBP73326
BCR-ABL1[Y253H/F359V]/BaF3	CBP73328

BCR-ABL1[Y253H/T315I]/BaF3	CBP73263
BCR-ABL1 [E355G]/BaF3	CBP73306
BCR-ABL1 [A337V]/BaF3	CBP73307
BCR-ABL1 [V299L]/BaF3	CBP73330
BCR-ABL1 [V468F]/BaF3	CBP73308
BCR-ABL1 [I502L]/BaF3	CBP73309
BCR-ABL1 [P223S]/BaF3	CBP73310
BCR-ABL1 [K294E]/BaF3	CBP73311
BCR-ABL1 [M244V]/BaF3	CBP73312
BCR-ABL1 [T315M]/BaF3	CBP73322
BCR-ABL1 [M351T]/BaF3	CBP73323