

BRAF K601E/BaF3

CBP73388

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	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

BRAF 基因位于染色体 7q34，编码丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，是 RAF 家族成员。BRAF 蛋白由 783 个氨基酸组成，从 N 端到 C 端依次为 CR1、CR2 和 CR3 三个保守区。其中 CR1 区由 RAS 蛋白结合区和富含半胱氨酸区组成，这两个区域均可与 RAS 结合；CR2 富含丝氨酸/苏氨酸，为调节磷酸化 RAF 激酶活性；CR3 区为 ATP 结合位点和激活区，含有酪氨酸和丝氨酸残基及有多个磷酸化位点，磷酸化后可激活 BRAF 蛋白和诱导性激活 ERK，ERK 主要参与有丝分裂和增殖。当 BRAF 基因突变，KRAS/AKT 通路过度激活，细胞循环紊乱，检查点相关通路异常，肿瘤细胞过度增殖，同时参与调控影响上皮间充质转换，影响机体免疫反应。BRAF 基因突变发生在大量癌症组织中，在甲状腺未分化癌，结直肠癌，皮肤黑色素瘤，原发灶不明的胃肠神经内分泌肿瘤，NSCLC，乳头状癌和小肠癌等多个癌肿中高达。根据突变信号转导机制和激酶活性可将 BRAF 突变分为 3 类，分别是 V600 突变激酶激活单体（I 类）、激酶激活性二聚体（II 类）和激酶失活性异源二聚体（III 类）。BRAF V600D/E/K/R 突变（I 类突变）导致强烈激活 BRAF 激酶活性，组成性活化 MAPK 通路，且对 BRAF 和 MEK 抑制剂敏感。BRAF K601，L597，G464 和 G469 突变是 II 类突变的代表，这些基因突变位于活化片段或位点，是 RAS 非依赖性的二聚物。BRAF G466，N581，D549 和 D596 突变是 III 类突变的代表，这些基因突变位于结合位点折叠的催化环或 DGF 基序，基底激酶活性低于野生型 BRAF 或缺乏激酶活性。

2. 产品介绍

科佰生物推出 BRAF K601E/BaF3 药靶细胞，其通过慢病毒转染的方法引入 K601E 突变状态的 BRAF 基因到 BaF3 细胞系中，稳定表达人突变形态下的 BRAF 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。

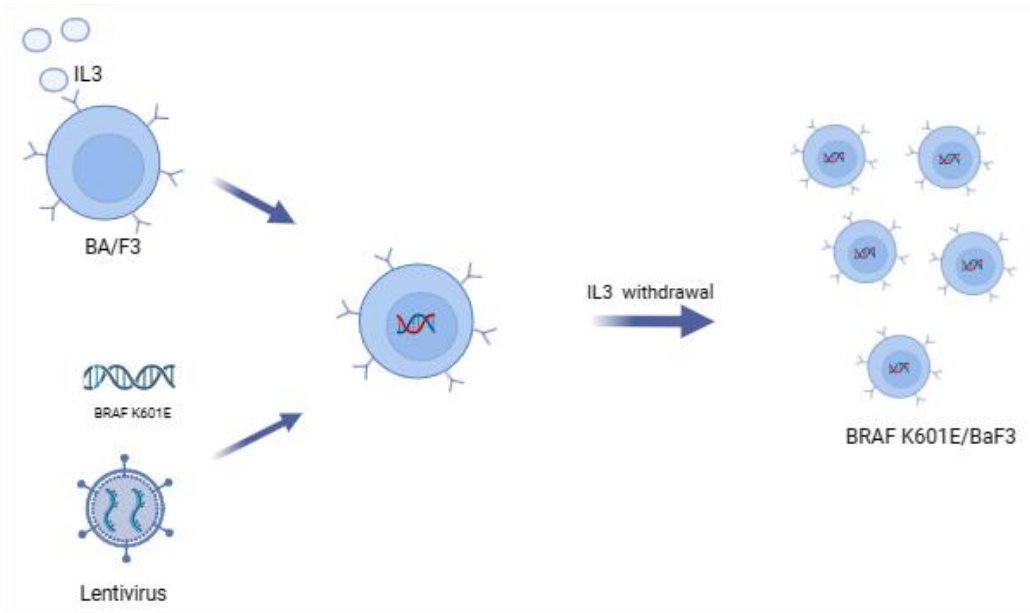


图 1: BRAF K601E/BaF3 细胞构建流程

3. 细胞基本信息

母细胞: Ba/F3

表达基因: BRAF K601E

传代培养基: RPMI-1640+10%FBS +2ug/ml puromycin

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
BRAF K601E/BaF3 完全培养基	Cobioer	CBP73388M
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 BRAF K601E/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% 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 2×10^6 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 8×10^6 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 BRAF K601E /BaF3 细胞,Cat. # CBP73388 开展,本实验使用 Dabrafenib、Belvarafenib、PLX8394 为测试样本，验证本模型的生物功能。

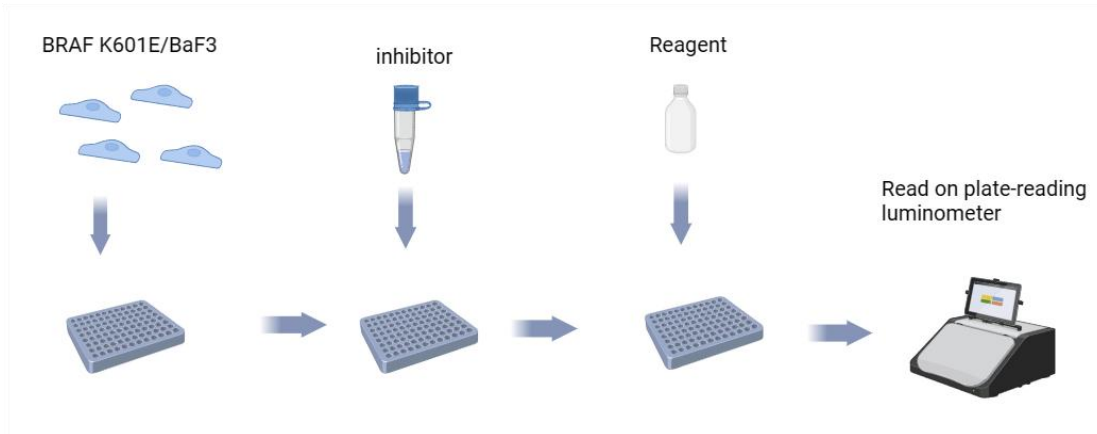


图 2: BRAF K601E/BaF3 增殖抑制实验流程示意图

- 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 $5 \times 10^4/\text{ml}$
- 2) 将重悬的细胞接种到白壁透明底的 96 孔细胞培养板中， $100\text{ul}/\text{孔}$ 细胞悬液，接种两块培养板，放置 37°C 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 $100\text{ul}/\text{孔}$ 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 $11.1\text{ ul}/\text{孔}$ ，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 $100\text{ul}/\text{孔}$ 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： $\text{Proliferation}\% = (\text{待测化合物孔 G3} - \text{G0 平均值}) / (\text{DMSO 对照孔 G3 平均值} - \text{G0 平均值}) * 100$ 。
- 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

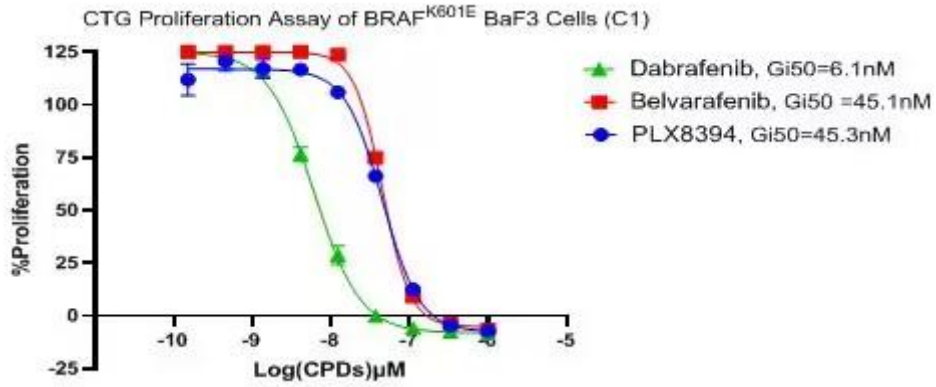


图 3: 使用 Dabrafenib、Belvarafenib、PLX8394 增殖抑制实验结果

7.2 WB 验证结果

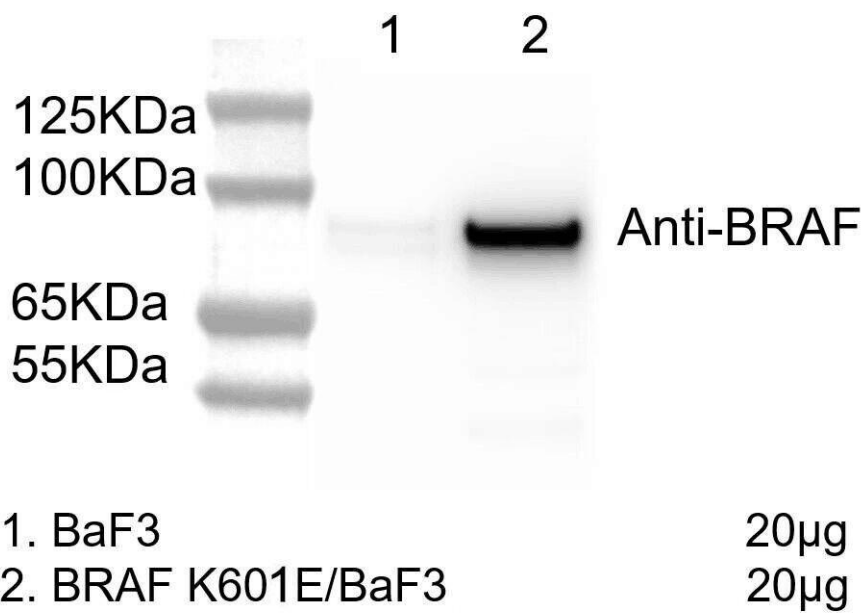


图 4: WB of BRAF K601E /BaF3 expression

7.3 Sanger 测序验证结果

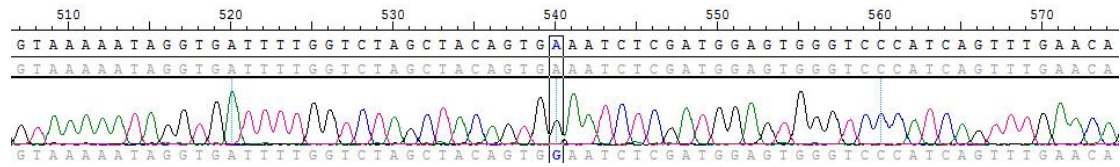


图 5：一代测序验证基因突变（BRAF K601E/BaF3）

8. 相关产品

名称	货号
BRAF V600R/BaF3	CBP73385
BRAF K601N/BaF3	CBP73386
BRAF K601E/BaF3	CBP73388
BRAF L597R/BaF3	CBP73387
KIAA1549-BRAF/BaF3	CBP73384
BRAF V600E/BaF3	CBP73389