

EGFR D770_N771

insSVD/BaF3

CBP73175

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	2
5.1 细胞复苏	2
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	4
7.2 WB 验证结果	5
7.3 Sanger 测序验证结果	5
8. 相关产品	5

1. 背景信息

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) 是上皮生长因子 (EGF) 细胞增殖和信号传导的受体, EGFR 是一种糖蛋白, 属于酪氨酸激酶型受体, 位于细胞膜表面, 靠与配体结合来激活。EGFR 与肿瘤细胞的增殖、血管生成、肿瘤侵袭、转移及细胞凋亡的抑制有关。EGFR 基因突变是预测 NSCLC 患者使用 EGFR-TKIs 疗效的重要靶标。EGFR 酪氨酸激酶区域的突变主要发生在 18-21 外显子, 其中 19 和 21 号外显子突变覆盖突变的 90%。EGFR 突变主要包括 4 种类型: 外显子 19 缺失突变、外显子 21 点突变、外显子 18 点突变和外显子 20 插入突变。最常见的 EGFR 突变为外显子 19 ELREA 缺失和外显子 21 L858R 突变, 二者均会导致酪氨酸激酶结构域活化。EGFR 基因突变可以分为两大类, 一个是药物敏感突变, 也就是突变后可以使用某种靶向药物 (如 19 缺失, L858R 突变), 另一个是耐药突变, 即突变后对某种靶向药物耐药 (如 T790M 突变)。

2. 产品介绍

科佰生物推出 EGFR D770_N771insSVD/BaF3 药靶细胞, 其通过慢病毒转染的方法引入 D770_N771insSVD 突变状态的 EGFR 基因到 BaF3 细胞系中, 稳定表达人突变形态下的 EGFR 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。

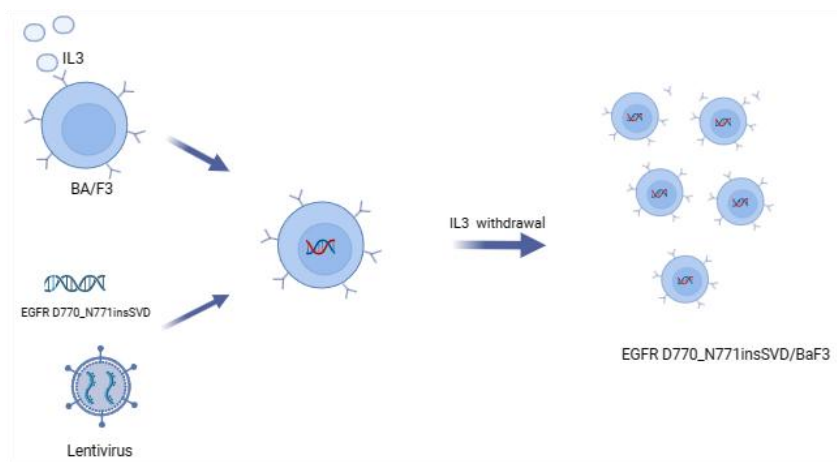


图 1: EGFR D770_N771insSVD/BaF3 细胞构建流程

3. 细胞基本信息

母细胞: Ba/F3

表达基因: EGFR D770_N771insSVD

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
EGFR D770_N771insSVD/BaF3 完全培养基	Cobioer	CBP73175M
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 EGFR D770_N771insSVD/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 EGFR D770_N771insSVD/BaF3 细胞,Cat. # CBP73175 开展，本实验使用 Poziotinib、Afatinib、AZD9291 为测试样本，验证本模型的生物功能。

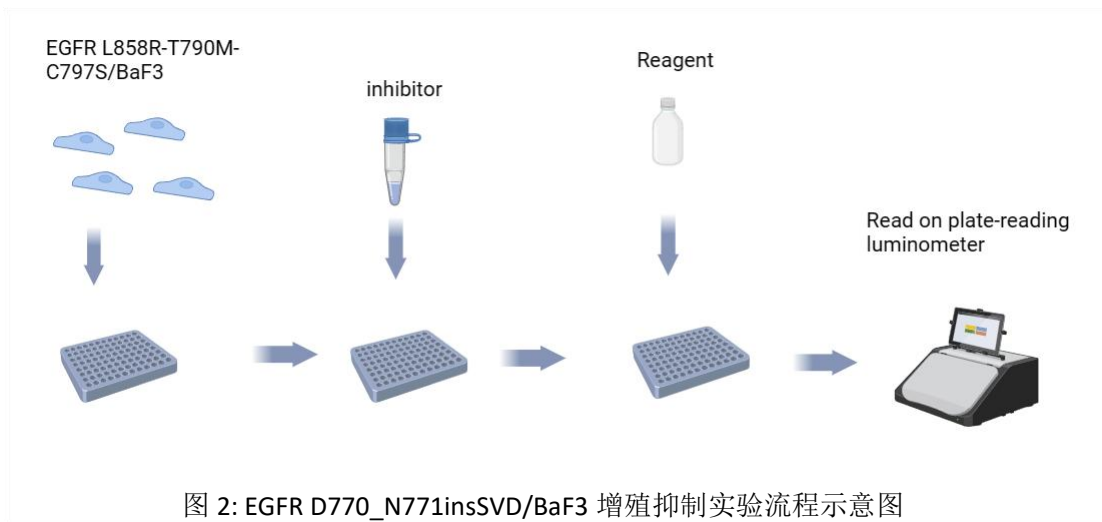


图 2: EGFR D770_N771insSVD/BaF3 增殖抑制实验流程示意图

- 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 5×10^4 /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： $\%Proliferation = (\text{待测化合物孔 } G3 - G0 \text{ 平均值}) / (\text{DMSO 对照孔 } G3 \text{ 平均值} - G0 \text{ 平均值}) * 100$ 。
- 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 EGFR D770_N771insSVD Cells (C2)

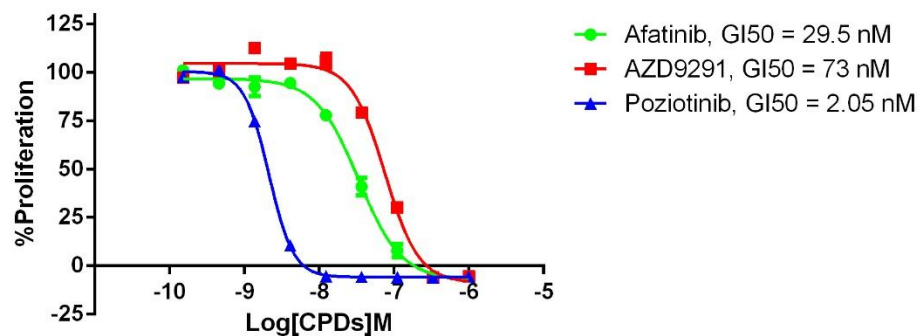


图 3: 使用 Poziotinib、Afatinib、AZD9291 增殖抑制实验结果

7.2 WB 验证结果

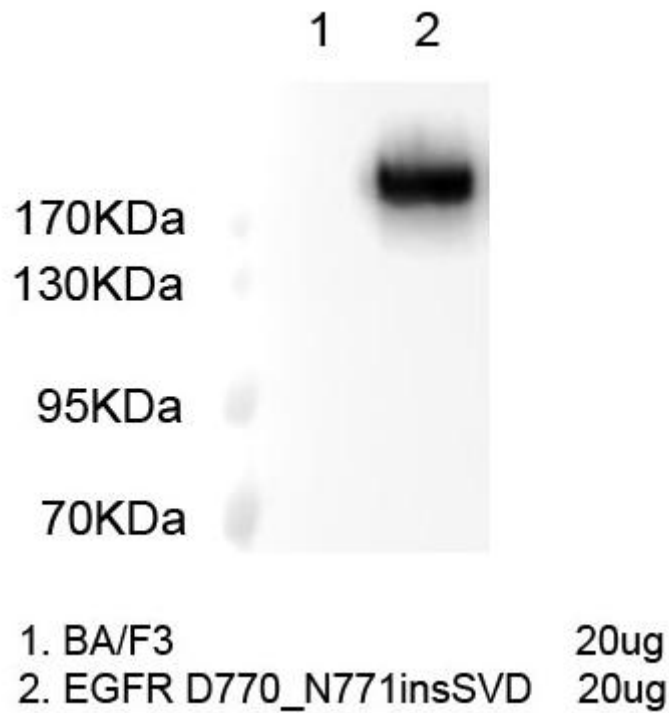


图 4: WB of EGFR D770_N771insSVD/BaF3 Expression

7.3 Sanger 测序验证结果

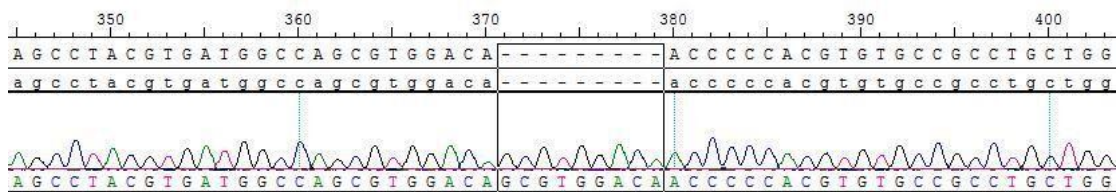


图 5: 一代测序验证基因突变(EGFR D770_N771insSVD)

8. 相关产品

名称	货号
EGFR A763_Y764insFQEA/BaF3	CBP73182
EGFR C797S/BaF3	CBP73167
EGFR D770_N771insG/BaF3	CBP73178

EGFR D770_N771insNPG/BaF3	CBP73180
EGFR D770_N771insSVD/BaF3	CBP73175
EGFR D770_N771insY/BaF3	CBP73218
EGFR D770>GY/BaF3	CBP73183
EGFR Del19/BaF3	CBP73045
EGFR Del19-C797S/BaF3	CBP73172
EGFR Del19-T790M/BaF3	CBP73046
EGFR Del19-T790M-C797S/BaF3	CBP73173
EGFR G719A/BaF3	CBP73170
EGFR G719D/BaF3	CBP73168
EGFR G719S/BaF3	CBP73169
EGFR H773_V774insAH/BaF3	CBP73220
EGFR H773_V774insH/BaF3	CBP73224
EGFR H773_V774insNPH/BaF3	CBP73177
EGFR H773_V774insPH/BaF3	CBP73219
EGFR H773_V774insPHPH/BaF3	CBP73223
EGFR L858R/BaF3	CBP73040
EGFR L858R-C797S/BaF3	CBP73047
EGFR L858R-T790M/BaF3	CBP73048
EGFR L858R-T790M-C797S/BaF3	CBP73049
EGFR L861Q/BaF3	CBP73050
EGFR P772_H773insDNP/BaF3	CBP73179
EGFR S768_V769delinsIL(S768I&V769L)/BaF3	CBP73181
EGFR S768I/BaF3	CBP73171
EGFR V769_D770insASV/BaF3	CBP73176
EGFR V769_D770insGSV/BaF3	CBP73217
EGFR V769_D770insGVV/BaF3	CBP73222
EGFR V769_D770insSFL/BaF3	CBP73221
EGFR VIII/BaF3	CBP73226

EGFR WT (EGF Dependent)/BaF3	CBP73166
EGFR L858R-T790M-C797S/NCI-H1975	CBP73213
EGFR Del19-T790M-C797S/PC9	CBP73212