CCDC6-RET WT/BaF3

CBP73214

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 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

RET 基因位于 10 号常染色体长臂(10q11.2)，全长 60kb，包含 21 个外显子，至少有 4 个转录产物，编码 1100 个氨基酸的酪氨酸激酶受体超家族 RET 蛋白。RET 蛋白是一种受体酪氨酸激酶，其包含胞外受体结合区、跨膜区以及胞内结合区构成。跨膜蛋白分为三个部分:蛋白的一端位于细胞外，一部分位于细胞膜中，另一端则位于细胞内。当 RET 蛋白与其配体—细胞外信号分子家族的胶质细胞源神经营养因子(GDNF)结合时，其将引起 RET 蛋白受体的磷酸化并使 RET 进入激活状态，被激活的 RET 产生二聚化并磷酸化其底物，造成下游信号通路的激活。RET 蛋白参与的信号通路包括 PI3K-AKT-mTOR 途径以及 RAS-RAF-MEK-ERK 途径。PI3K-AKT-mTOR 途径参与细胞存活，而 RAS-RAF-MEK-ERK 通路参与细胞增殖，RET 基因是一种重要的癌基因，激活的 RET 蛋白通过多种信号通路参与不同肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭，影响肿瘤的发生发展。CCDC6(全名:coiled-coildomain containing 6)基因编码一种含卷曲螺旋结构域(coiled-coil domain)的蛋白,并被认为可能是一种抑癌基因,它位于 10 号染色体长臂,全长 117kb 左右(含 9 个外显子)。CCDC6-RET 融合基因会导致包括丝裂原活化蛋白激酶、PI3K/AKT 和 Janus 激酶/信号转导和转录激活因子在内的细胞内通路的癌基因激活,使细胞增殖和生长不受抑制,从而促进肿瘤生长。CCDC6-RET 融合基因存在甲状腺乳头状癌（PTC）、NSCLC，亦可见于结直肠癌、唾液腺癌、卵巢癌等其他多种癌种中。

2. 产品介绍

科佰生物推出 CCDC6-RET WT/BaF3 药靶细胞，其通过慢病毒转染的方法引入 WT 状态的 CCDC6-RET 基因到 BaF3 细胞系中，稳定表达人突变形态下 CCDC6-RET WT 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。

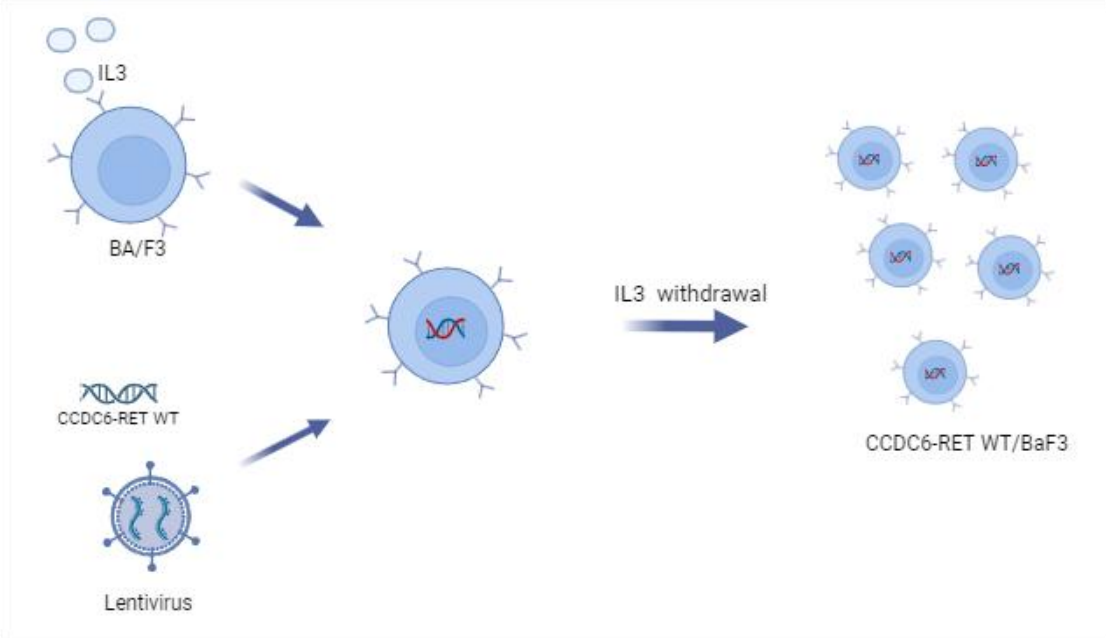

图 1: CCDC6-RET WT/BaF3 细胞构建流程

3. 细胞基本信息

母细胞: Ba/F3

表达基因: CCDC6-RET WT

传代培养基: RPMI-1640+10%FBS+1ug/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
CCDC6-RET WT/BaF3 完全培养基	Cobioer	CBP73214M
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

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 CCDC6-RET WT/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 8x10^6 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 CCDC6-RET WT /BaF3 细胞,Cat. # CBP73214 开展，本实验使用 Cabozantinib 为测试样本，验证本模型的生物功能。

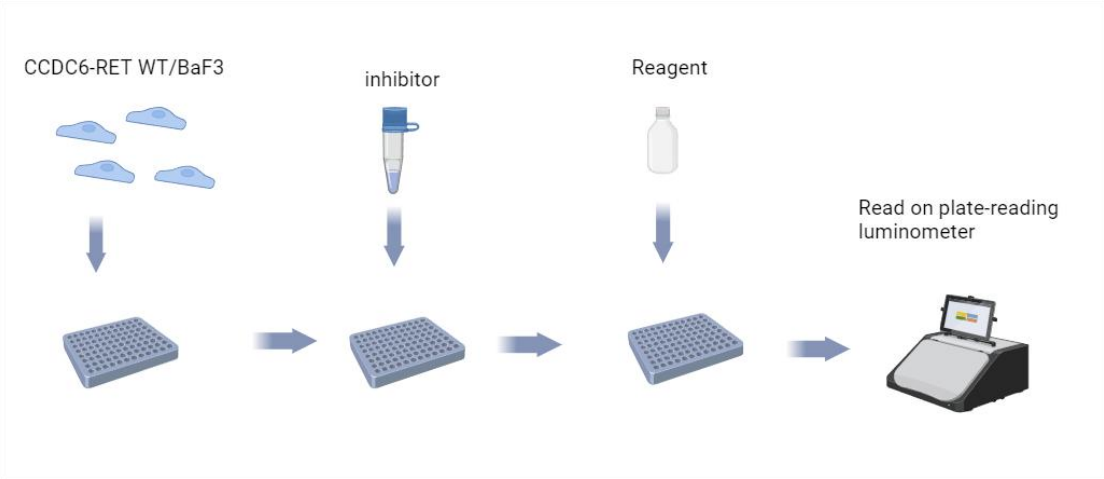

图 2: CCDC6-RET WT/BaF3 增殖抑制实验流程示意图

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

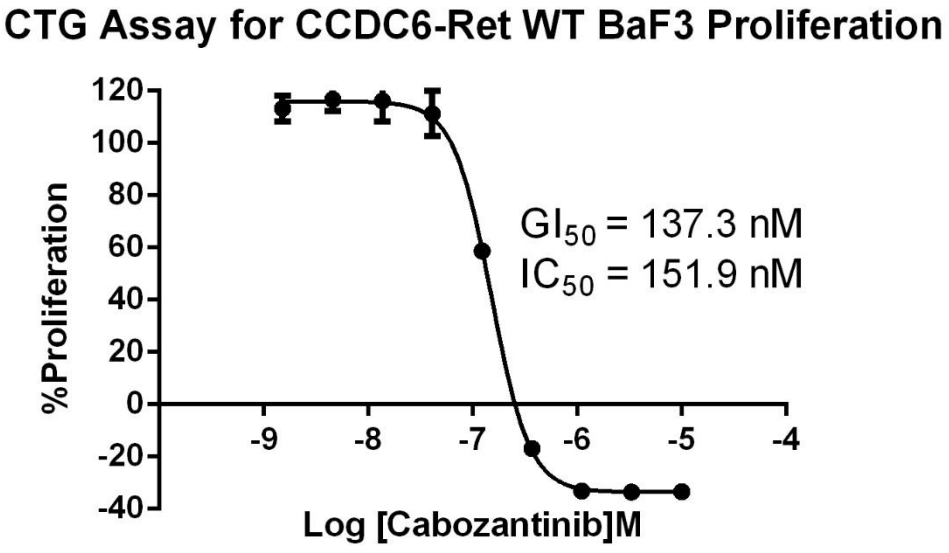

图 3：使用 Cabozantinib 增殖抑制实验结果

7.2 WB 验证结果

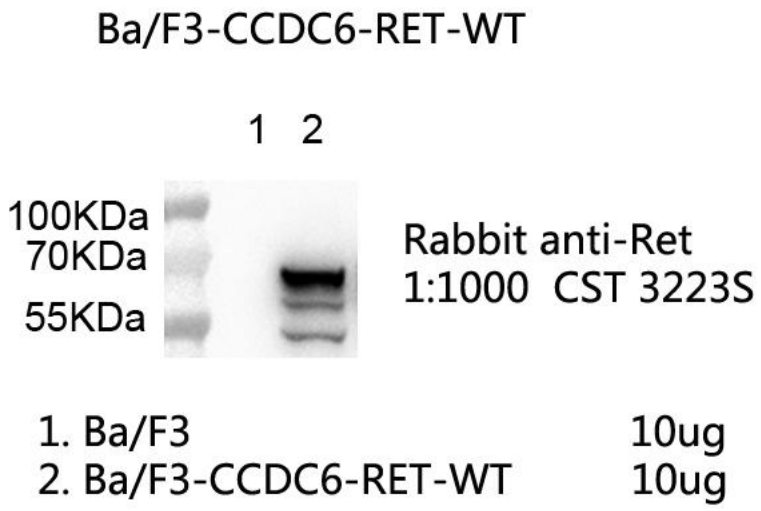

图 4：WB of CCDC6-RET WT/BaF3

7.3 Sanger 测序验证结果

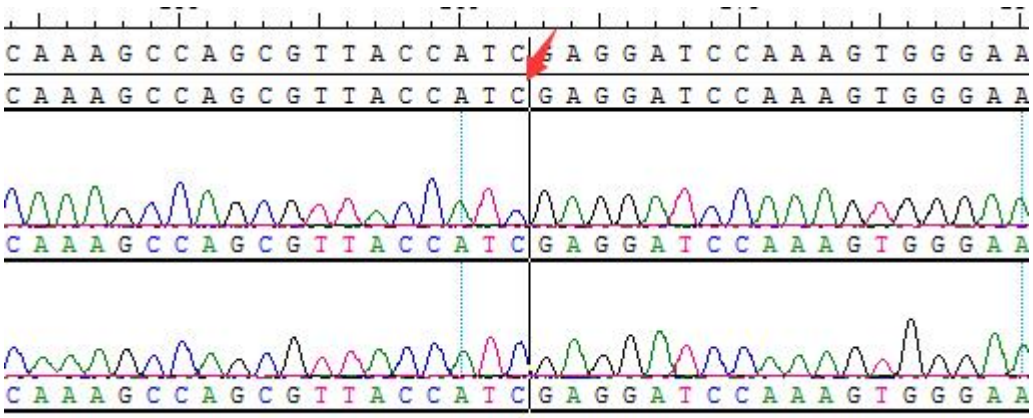

图 5：一代测序验证基因突变（CCDC6-RET WT/BaF3）

8. 相关产品

CCDC6-RET [V804L]/BaF3	CBP73215
CCDC6-RET [V804M]/BaF3	CBP73216
CCDC6-RET WT/BaF3	CBP73214