

CSF3R T618I/BaF3

CBP73253

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
8. 相关产品	5

1. 背景信息

CSF3R 基因，又名 G-CSFR，是造血细胞受体家族成员之一，其配体为 G-CSF 的受体，该基因位于染色体 1p34.3，可促进中性粒细胞的增殖存活以及分化，正常状态下其本身没有酪氨酸激酶活性，但是可以通过其配体结合激活其激酶活性并引起下游包括 JAKs、SRC 激酶家族以及 SYK、TNK 等一系列激酶的活性，参与到包括 STAT、PI3-K-AKT 以及 RAS-MAPK 等重要的细胞信号通路中，发挥其生物学功能。CSF3R 突变主要分为两大类，一类是膜近端突变，常见的如 T618I, T615A 等，其中 T618I 突变在 CNL 中最为常见，在临床上约占到 80% 以上；另一类是由于移码或者点突变导致蛋白编码提前终止，由此引发的截短突变（如 Q741*, Y752*, W791*, D771fs, S783fs 等），这两类突变均可以导致 CSF3R 不再依赖其配体激活，自带组成性激酶活性，进而导致 JAK-STAT 信号通路组成性激活，驱动肿瘤细胞的生长。

2. 产品介绍

科佰生物推出 CSF3R T618I/BaF3 药靶细胞，其通过慢病毒转染的方法引入 T618I 突变状态的 CSF3R 基因到 BaF3 细胞系中，稳定表达人突变形态下 CSF3R T618I 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。

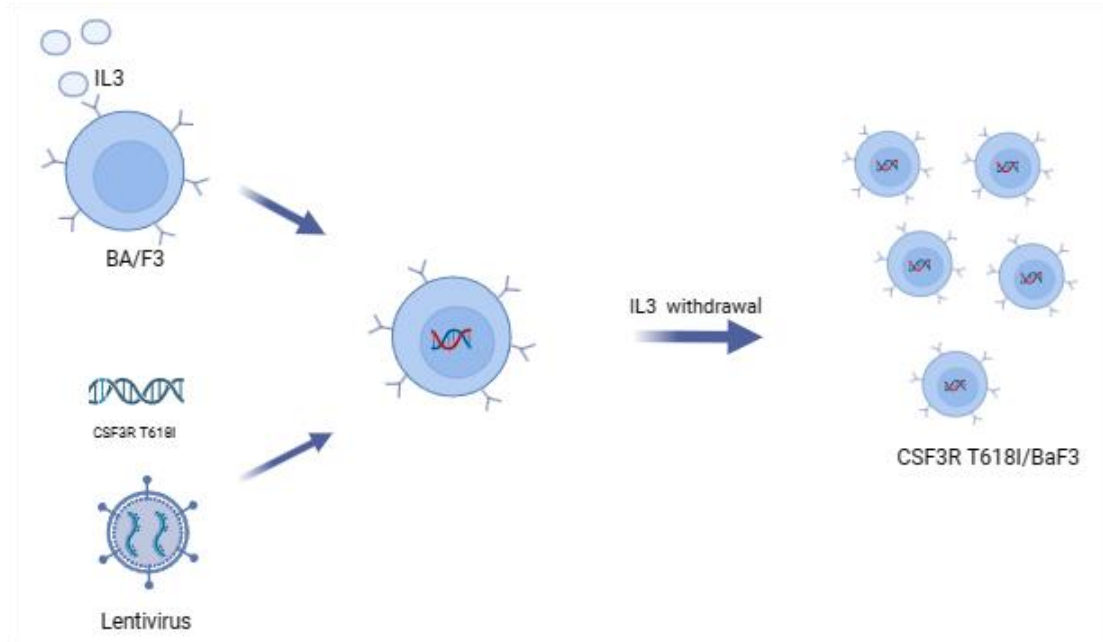


图 1: CSF3R T618I/BaF3 细胞构建流程

3. 细胞基本信息

母细胞: Ba/F3

表达基因: CSF3R T618I

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
CSF3R T618I/BaF3 完全培养基	Cobioer	CBP73253M
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 CSF3R T618I/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 CSF3R T618I /BaF3 细胞,Cat. # CBP73253 开展，本实验使用 BLZ945、Dasatinib、Ruxolitinib 为测试样本，验证本模型的生物功能。

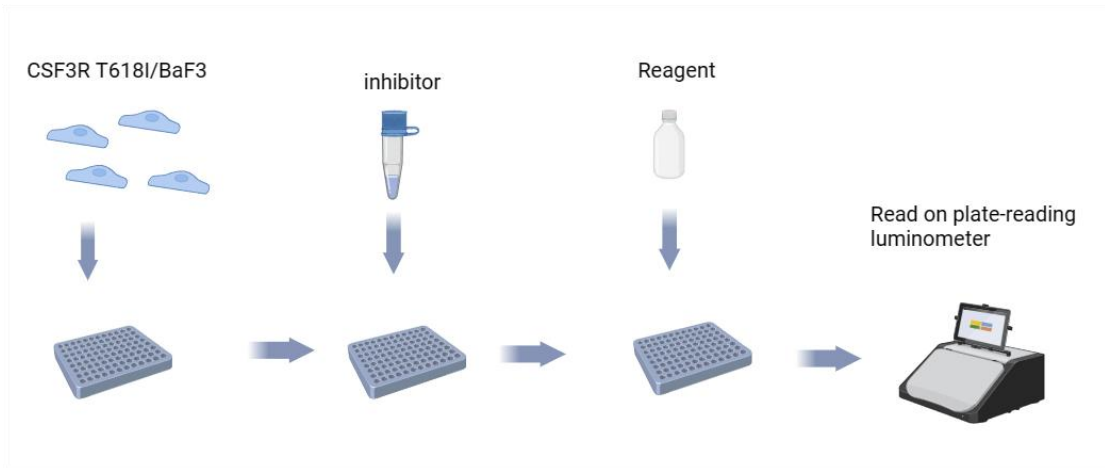


图 2: CSF3R T618I/BaF3 增殖抑制实验流程示意图

- 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 G_0 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 G_3 数据。
- 6) 根据以下公式计算每个孔对应的细胞增殖率： $\text{Proliferation}\% = (\text{待测化合物孔 } G_3 - G_0 \text{ 平均值}) / (\text{DMSO 对照孔 } G_3 \text{ 平均值} - G_0 \text{ 平均值}) * 100$ 。
- 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 GI_{50} (GI_{50} 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 CSF3R T618I (Clone 6)

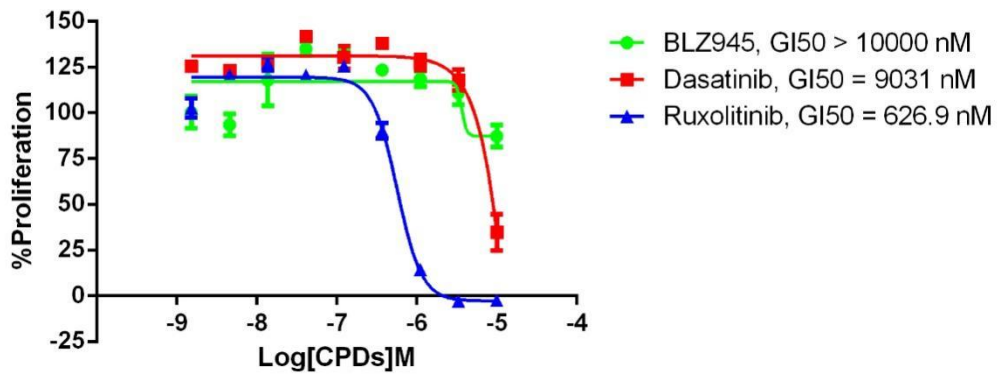


图 3: 使用 BLZ945、Dasatinib、Ruxolitinib 增殖抑制实验结果

7.2 WB 验证结果

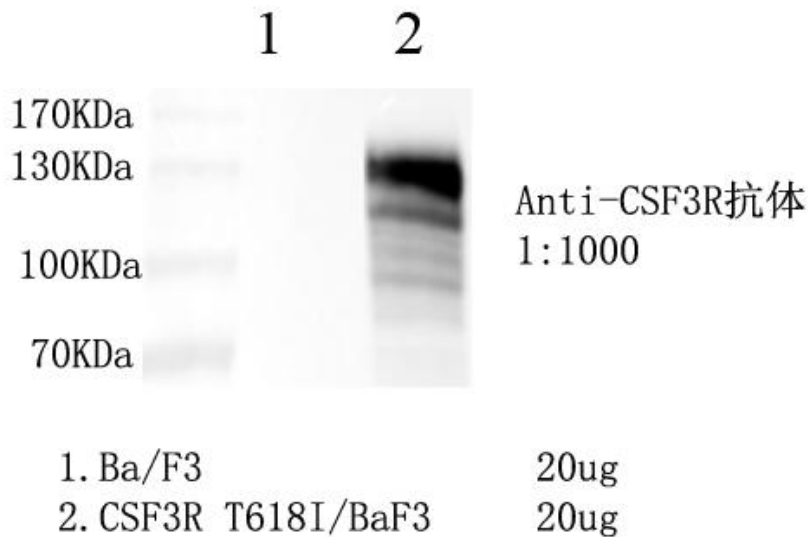


图 4: WB of CSF3R T618I/BaF3

8. 相关产品

CSF3R WT/BaF3

CBP73264

CSF3R T615A/BaF3	CBP73252
CSF3R T618I/BaF3	CBP73253
CSF3R Q741*/BaF3	CBP73254
CSF3R S783fs/BaF3	CBP73255