EGFR L858R-T790M-C797S/NCI-H1975

CBP73213

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 5
7.1 增殖抑制实验验证结果 5
7.2 WB 验证结果 6
7.3 Sanger 测序验证结果 6
8. 相关产品 7

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 L858R-T790M-C797S/NCI-H1975 药靶细胞，其通过慢病毒转染的方法引入三种不同突变状态 L858R-T790M-C797S 的 EGFR 基因到 NCI-H1975 细胞系中，稳定表达人突变形态下的 EGFR 基因。

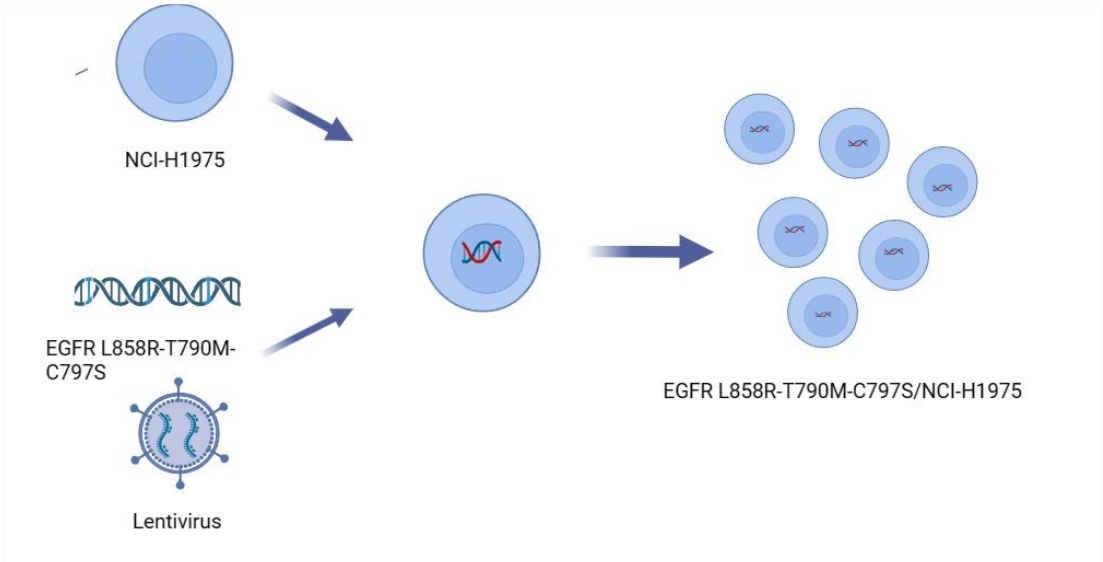


图 1:　EGFR L858R-T790M-C797S/NCI-H1975 细胞构建流程

3. 细胞基本信息

母细胞: NCI-H1975

表达基因: EGFR L858R-T790M-C797S

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：贴壁

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 L858R-T790M-C797S/NCI-H1975 完全培养基	Cobioer	CBP73213M
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 L858R-T790M-C797S/NCI-H1975 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) 加入 T25 培养瓶中，放入 37°C、5% CO2 培养箱中。
4) 复苏 24-36 小时左右换液或传代，将未贴壁的死细胞去掉。

5.2 细胞传代

1) 当细胞密度符合传代要求时，PBS 清洗细胞，加入 1ml 胰酶，消化细胞传代。当 80%以上细胞培养瓶轻轻晃动能脱落时，加培养基终止消化，吹打成单细胞，吸入 15ml 离心管，1000 转离心 5 分钟。
2) 离心后弃上清，加入新培养基吹打重悬细胞成单细胞，加入新的培养瓶中继续培养。

5.3 细胞冻存

每个 T75 或 10cm 培养皿的细胞消化离心后弃上清。加 2ml 细胞冻存液(90% FBS+10%DMSO)，吹打均匀，加入 2 个细胞冻存管。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 L858R-T790M-C797S/NCI-H1975 细胞,Cat. #CBP73213 开展，本实验使用 Gefitinib、AZD9291、TQB3804 为测试样本，验证本模型的生物功能。

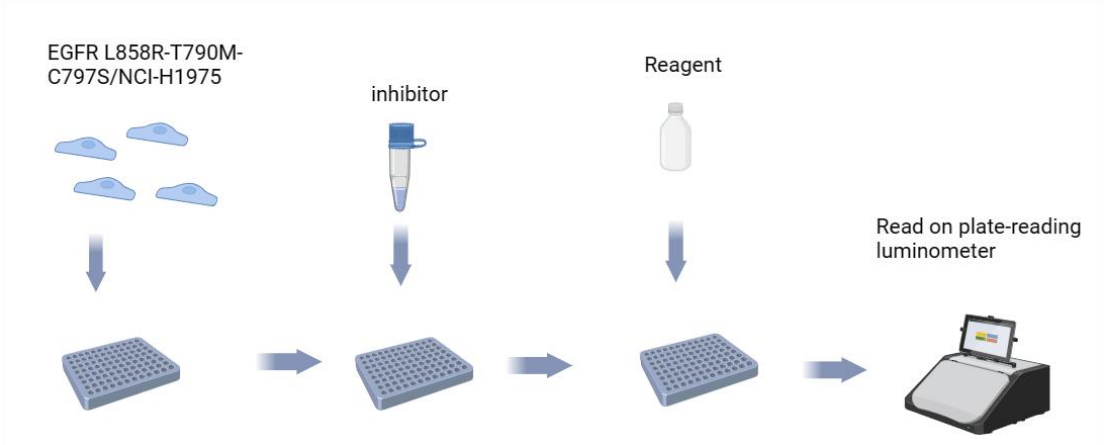


图 2: EGFR L858R-T790M-C797S/NCI-H1975 增殖抑制实验流程示意图

1) 取对数生长的细胞，胰酶消化离心弃培养上清，将离心下来的细胞重悬于新鲜 RPMI1640 培养基中，细胞密度为 $2x10^4$/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 度细胞培养箱过夜。

3) 第二天，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。

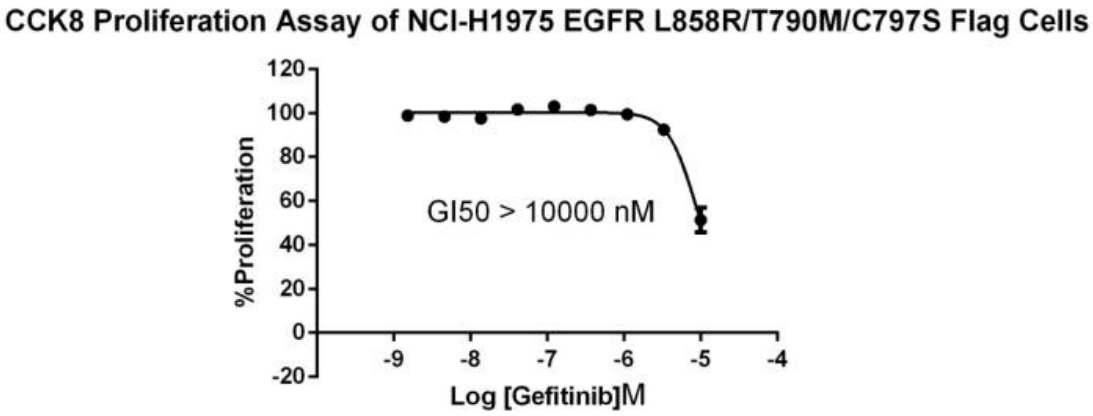
5) 将化合物处理过 72 小时的 96 孔板从培养箱中取出，加入 100ul/孔细胞活力检测试剂放置 30 分钟，读取数值，定义为 G3 数据。

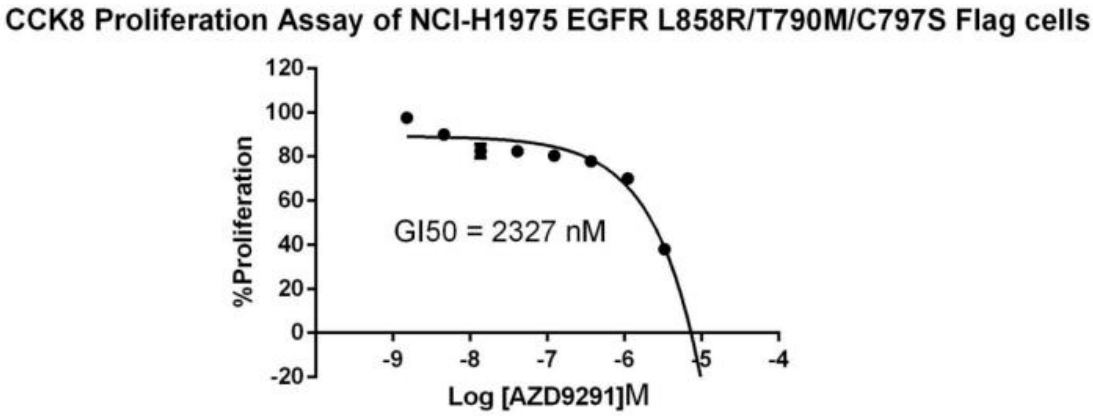
6) 根据以下公式计算每个孔对应的细胞增殖率：%Proliferation =（待测化合物孔 G3 – G0 平均值）/（DMSO 对照孔 G3 平均值 – G0 平均值）*100 。

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





Compound	GI50（nM）
Gefitinib	>10000
AZD9291	2327

图 3：使用 Gefitinib、AZD9291 增殖抑制实验结果

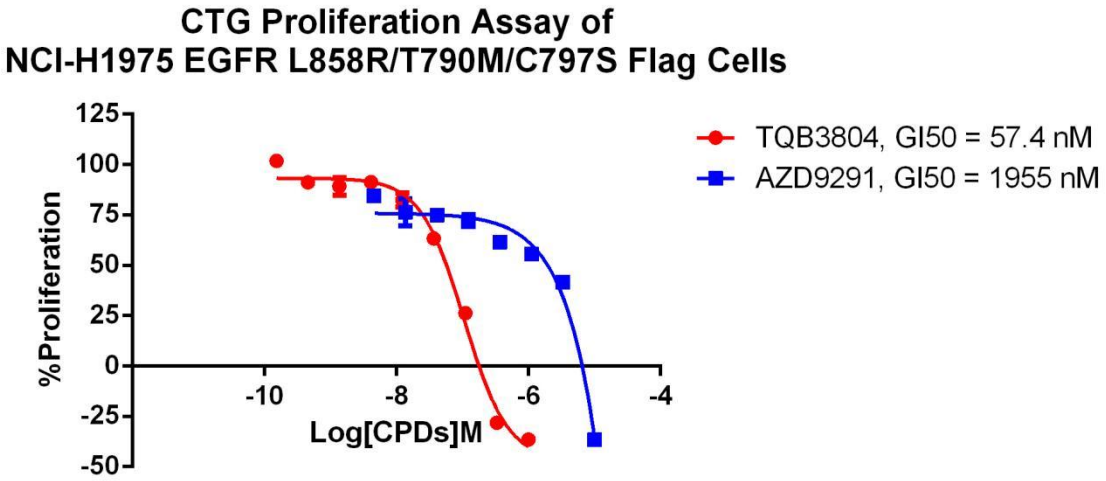


图 4：使用 TQB3804、AZD9291 增殖抑制实验结果

7.2 WB 验证结果

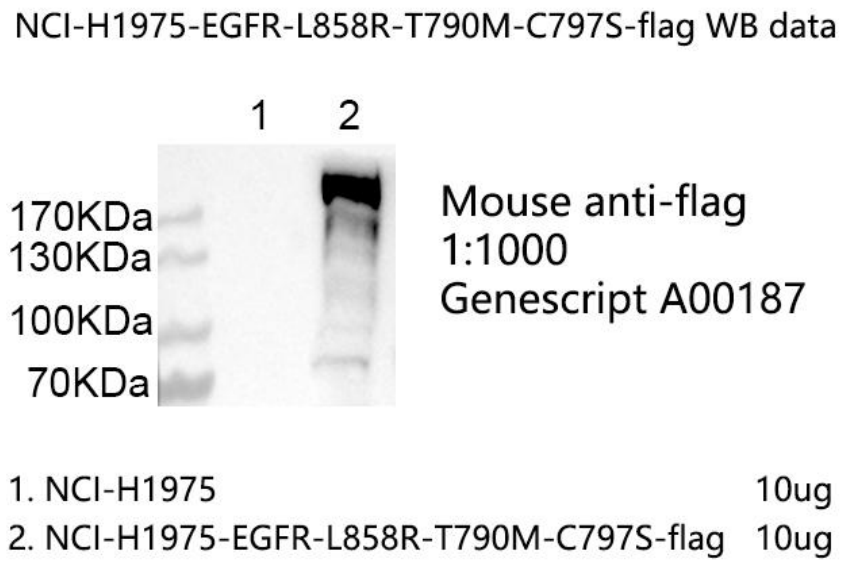


图 5：WB of EGFR Expression

7.3 Sanger 测序验证结果

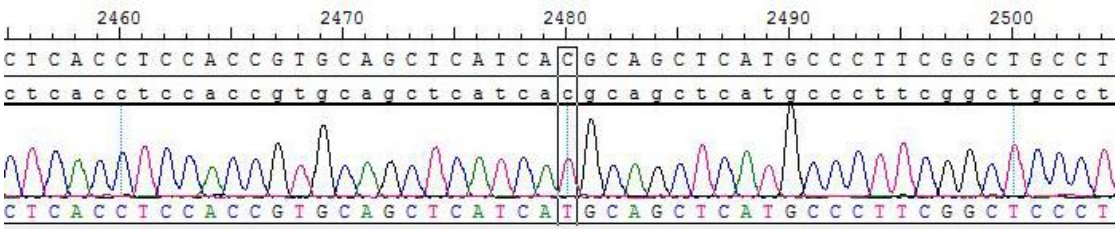


图 6：一代测序验证基因突变（T790M）

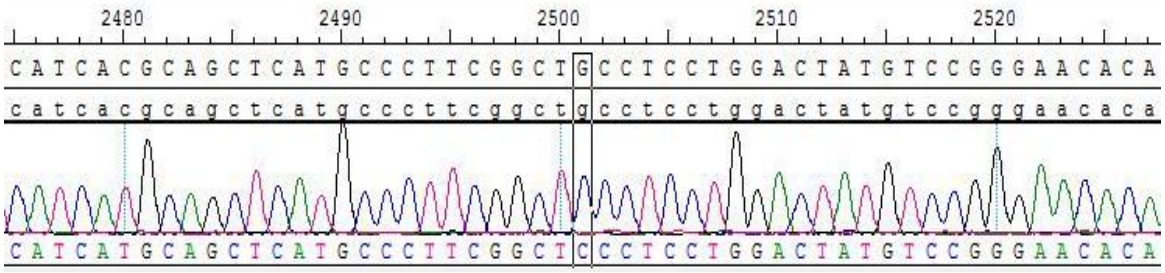


图 7：一代测序验证基因突变（C797S）

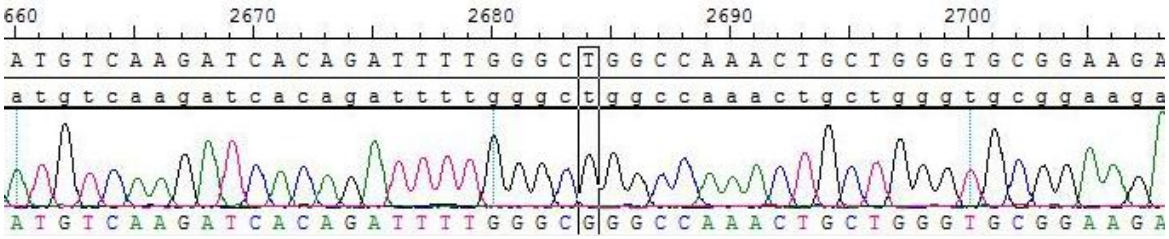


图 8：一代测序验证基因突变（L858R）

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