EML4-ALK V1 [C1156Y/G1202R]/BaF3

CBP73364

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 Sanger 测序验证结果 5
8. 相关产品 6

1. 背景信息

EML4-ALK 融合基因定位于 2 号染色体的短臂上(2p21 和 2p23)，其 5’端为 EML4 的片段，3’端为 ALK 的片段，由倒置后的 EML4 基因片段与残余的 ALK 片段连接。ALK 和 EML4 的融合基因能够产生一种具有致瘤活性的融合蛋白即 EML4-ALK 融合蛋白，该蛋白由 EML4 的氨基末端与 ALK 的胞内近薄膜部分的激酶域结合所形成，EML4 的氨基末端部分对 ALK 激酶域的本构二聚作用，导致下游信号通路如 AKT,STAT3 和膜外信号调节激酶 1 和 2(ERK1/2)的异常激活，使细胞增殖，永生化和骨架及外形的改变。ALK 的激活有助于细胞的生长、增殖、存活和迁移,而 EML4-ALK 融合基因中 EML4 激活 ALK 酪氨酸激酶区从而导致细胞的恶性增殖，引起癌变。EML4-ALK 融合基因由于断裂相接的位置不同存在多种亚型，目前至少发现了 20 多种 EML4-ALK 融合亚型，EML4 基因有很多断裂点，而 ALK 只有跨膜结构 N 端这一个融合位点，这些亚型中大多数都能够促进肿瘤形成。融合变异体对 EML4-ALK 抑制剂表现出不同的敏感性。其中 EML4-ALK 融合中最常见的变体亚型为 V1 和 v3a/b，约占所有 EML4-ALK 融合突变的 70%。V1 亚型是外显子 13 与 ALK 的外显子 20[E13; A20]长融合，V3a / b 亚型分别是 EML4 的外显子 6a / b 与 ALK 的外显子 20 短融合[E6a / b; A20]和[E6a / b; A20]短融合。各种 ALK 融合亚型的融合伴侣不同，表达形成的蛋白质构型也有不同，因此也导致了蛋白质稳定性及酪氨酸激酶活性差异。

2. 产品介绍

科佰生物推出 EML4-ALK V1 [C1156Y/G1202R]/BaF3 药靶细胞，其通过慢病毒转染的方法引入 C1156Y/G1202R 突变状态的 EML4-ALK V1 基因到 BaF3 细胞系中，稳定表达人突变形态下 EML4-ALK V1 [C1156Y/G1202R]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。

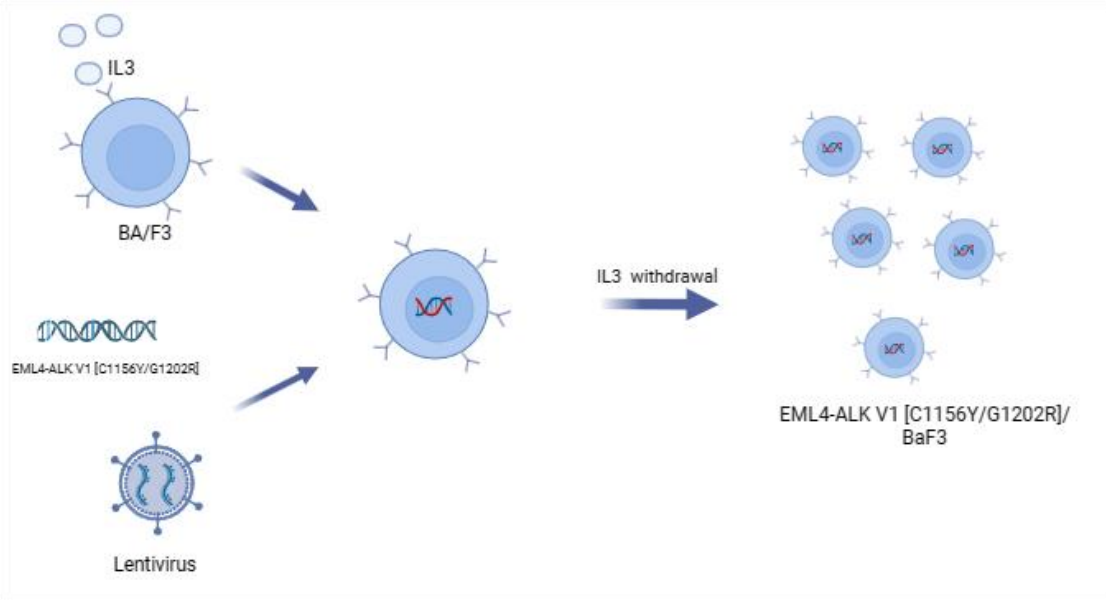

图 1: EML4-ALK V1 [C1156Y/G1202R]/BaF3 细胞构建流程

3. 细胞基本信息

母细胞: Ba/F3

表达基因: EML4-ALK V1 [C1156Y/G1202R]

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
EML4-ALK V1 [C1156Y/G1202R]/BaF3 完全培养基	Cobioer	CBP73364M
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 EML4-ALK V1 [C1156Y/G1202R]/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 EML4-ALK V1 [C1156Y/G1202R] /BaF3 细胞,Cat. # CBP73364 开展，本实验使用 Crizotinib、TPX-0131、Lorlatinib 为测试样本，验证本模型的生物功能。

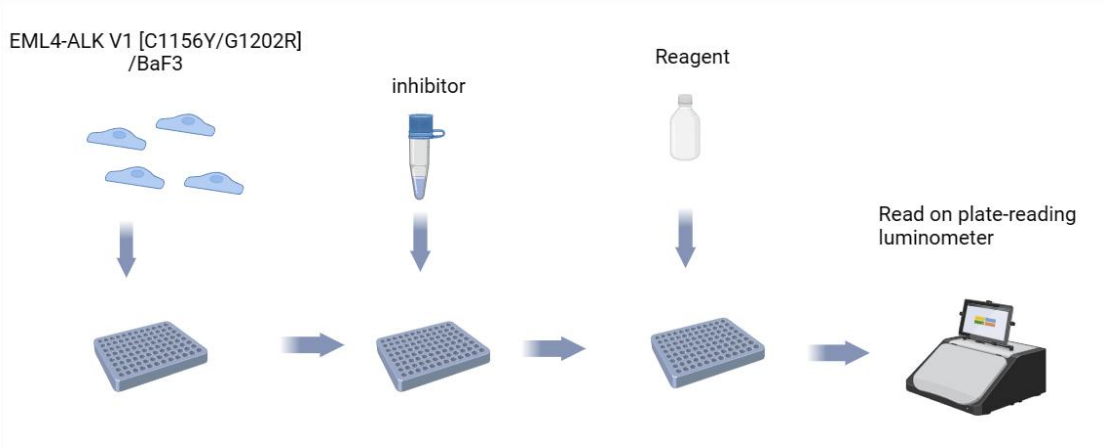

图 2: EML4-ALK V1 [C1156Y/G1202R]/BaF3 增殖抑制实验流程示意图

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

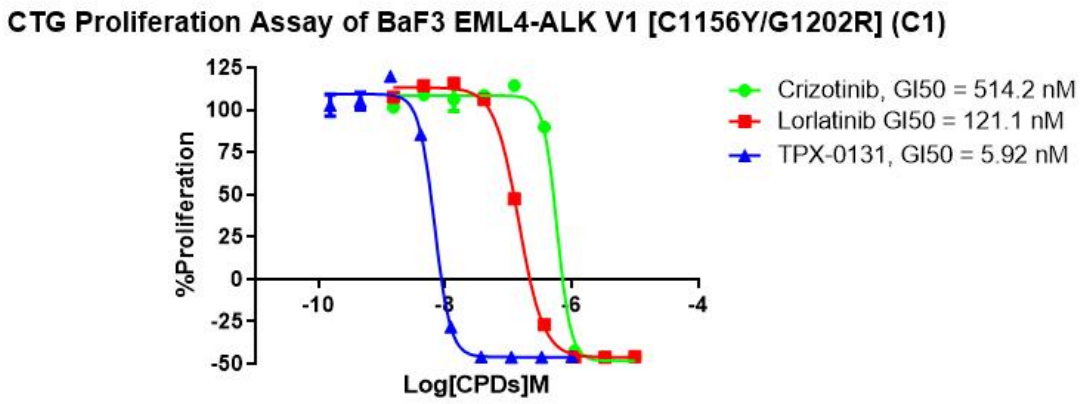

图 3：使用 Crizotinib、TPX-0131、Lorlatinib 增殖抑制实验结果

7.2 Sanger 测序验证结果

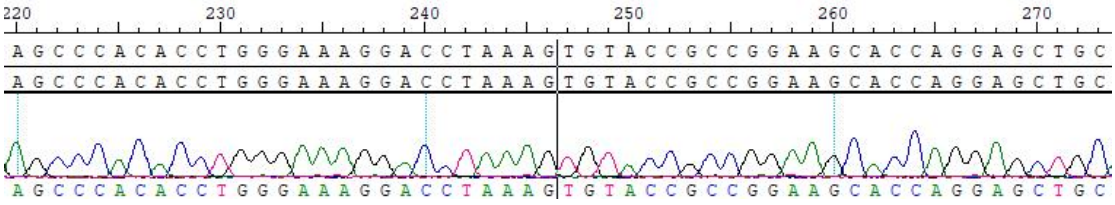

图 4：一代测序验证基因突变（ EML4-ALK V1 [C1156Y/G1202R]/BaF3 Fusion）

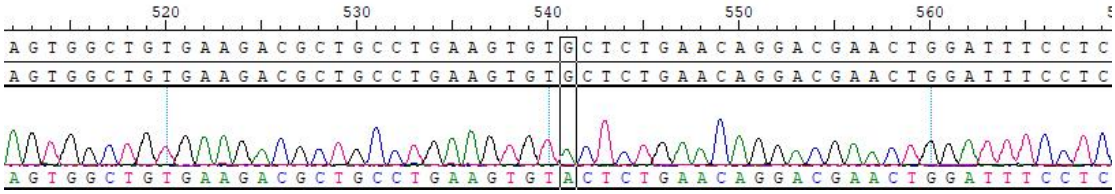

图 5：一代测序验证基因突变（C1156Y）

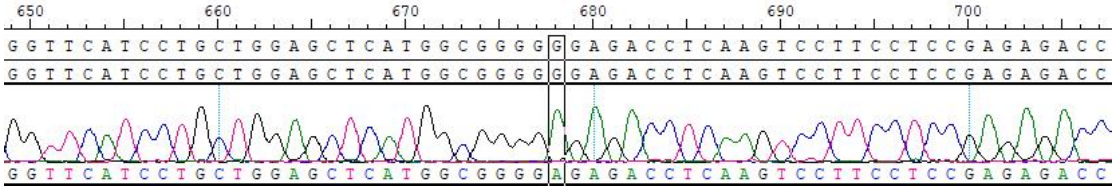

图 6：一代测序验证基因突变（ G1202R）

8. 相关产品

EML4-ALK V1/BaF3	CBP73185
EML4-ALK V1 [C1156Y]/BaF3	CBP73189
EML4-ALK V1 [C1156Y/G1202R]/BaF3	CBP73364
EML4-ALK V1 [C1156Y/L1198F]/BaF3	CBP73351
EML4-ALK V1 [F1174L]/BaF3	CBP73188
EML4-ALK V1 [G1202R]/BaF3	CBP73200
EML4-ALK V1 [I1171T]/BaF3	CBP73353
EML4-ALK V1 [I1171S]/BaF3	CBP73354
EML4-ALK V1 [L1196M]/BaF3	CBP73187
EML4-ALK V1 [L1196M/L1198F]/BaF3	CBP73352
EML4-ALK V1 [L1198F]/BaF3	CBP73343
EML4-ALK V1 [D1203N]/BaF3	CBP73342
EML4-ALK V1 [G1202R/L1196M]/BaF3	CBP73271
EML4-ALK V1 [G1202R/L1198F]/BaF3	CBP73272
EML4-ALK V1 [G1202R/G1269A]/BaF3	CBP73273
EML4-ALK V1 [G1202R/G1269A/L1204V]/BaF3	CBP73339
EML4-ALK V1 [G1202R/G1269A/L1198F]/BaF3	CBP73340
EML4-ALK V1 [G1269A]/BaF3	CBP73341
EML4-ALK V1 [G1269S]/BaF3	CBP73350
EML4-ALK V1 [I1171N]/BaF3	CBP73299
EML4-ALK V1 [I1171N/F1174I]/BaF3	CBP73300
EML4-ALK V1 [I1171N/L1198H]/BaF3	CBP73301
EML4-ALK V3a/BaF3	CBP73199
EML4-ALK V3b/BaF3	CBP73186