ETV6-NTRK3 [G696A]/BaF3

CBP73209

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 6
   7.3 Sanger 测序验证结果 6
8. 相关产品 7

1. 背景信息

ETV6 定位于 12p13, DNA 长度约 300kb,含有 8 个外显子。编码蛋白相对分子质量为 53 × 10^3,含有 452 氨基酸,是 EIS(E-Twen-ty-Six)癌基因转录因子家族中一种序列特异性的转录抑制因子，通过与 Fli-1 结合抑制其活性,在早期造血和血管生成中起着重要作用。同 EIS 家族某些其他成员一样,ETV6 含有两个重要的保守结构:N 端的螺旋-环-螺旋(helix-loop-helix,HLH)和 C 端的 EIS 结构域。HLH 结构由第 3,4 外显子编码,介导 ETV6 的间源或与 EIS 家族其他成员的异源二聚化。NIRK3 定位于 15q25 , DNA 379.612kb,含有 18 个外显子。编码神经营养因子 3 的跨膜受体,相对分子质量 94.4x 10^3,含有 839 氨基酸。由胞外配体结合区,跨膜区和胞内酪氨酸激酶区组成。在神经系统的生长发育中起重要作用。除神经系统外,造血细胞,上皮细胞和多种软组织肿瘤中也有表达。ETV6-NTRK3 融合基因是通过 ETV6 的 1~5 外显子与 NIRK3 的 13~18 外显子融合在一起形成的，通过 ETV6 的 HLH 结构与 NTRK3 的 C 端结合形成融合蛋白。HLH 结构域对于 ETV6-NTRK3 的功能至关重要,它含有两个有力的结合位点,介导了 ETV6-NTRK3 的多聚化和酪氨酸磷酸化。NTRK3 残端由 298 个氨基酸组成,包含了蛋白酪氨酸激酶结构域，但是缺少了野生型 NTRK 的 516 位酪氨酸和 KFG 序列。表达 ETV6-NTRK3 的肿瘤有 CFS、CMN、急性髓系白血病和分泌型乳腺癌(Secretory breast carcinoma，SBC)。

2. 产品介绍

科佰生物推出 ETV6-NTRK3 [G696A]/BaF3 药靶细胞，其通过慢病毒转染的方法引入 G696A 突变状态的 ETV6-NTRK3 基因到 BaF3 细胞系中，稳定表达人突变形态下 ETV6-NTRK3 [G696A]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。

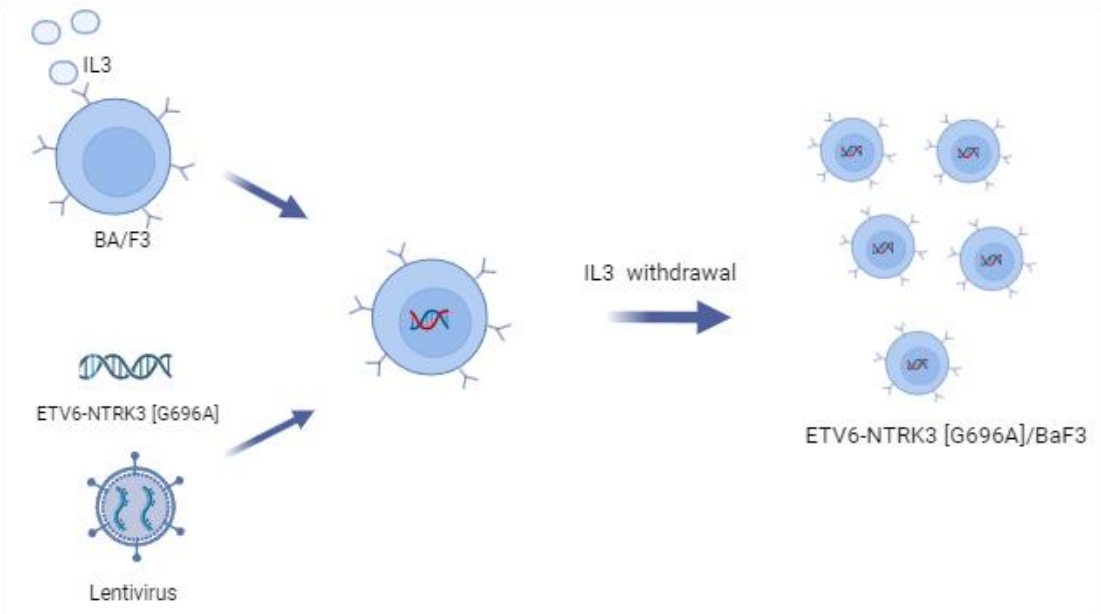

图 1:ETV6-NTRK3 [G696A]/BaF3 细胞构建流程

3. 细胞基本信息

母细胞: Ba/F3

表达基因:ETV6-NTRK3 [G696A]

传代培养基: RPMI-1640+10% FBS+2 ug/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
ETV6-NTRK3 [G696A]/BaF3 完全培养基	Cobioer	CBP73209M
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 ETV6-NTRK3 [G696A]/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 ETV6-NTRK3 [G696A]/BaF3 细胞,Cat. # CBP73209 开展，本实验使用 LOXO-101、LOXO-195 为测试样本，验证本模型的生物功能。

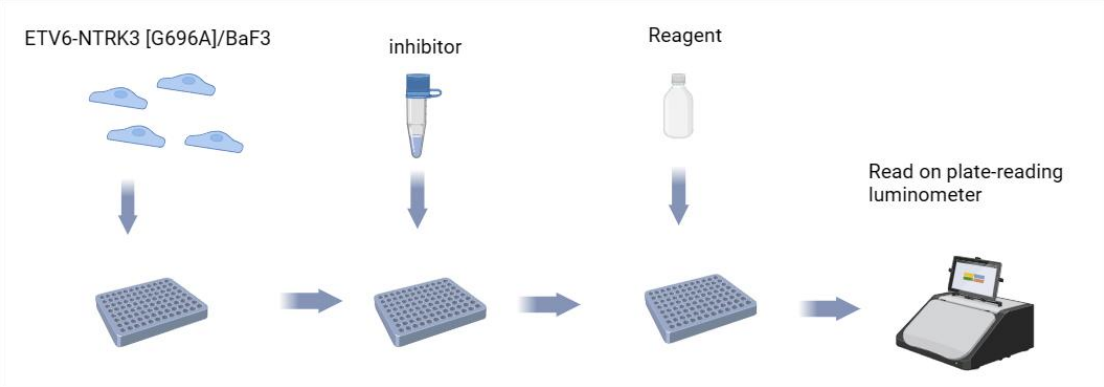

图 2: ETV6-NTRK3 [G696A]/BaF3 增殖抑制实验流程示意图

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

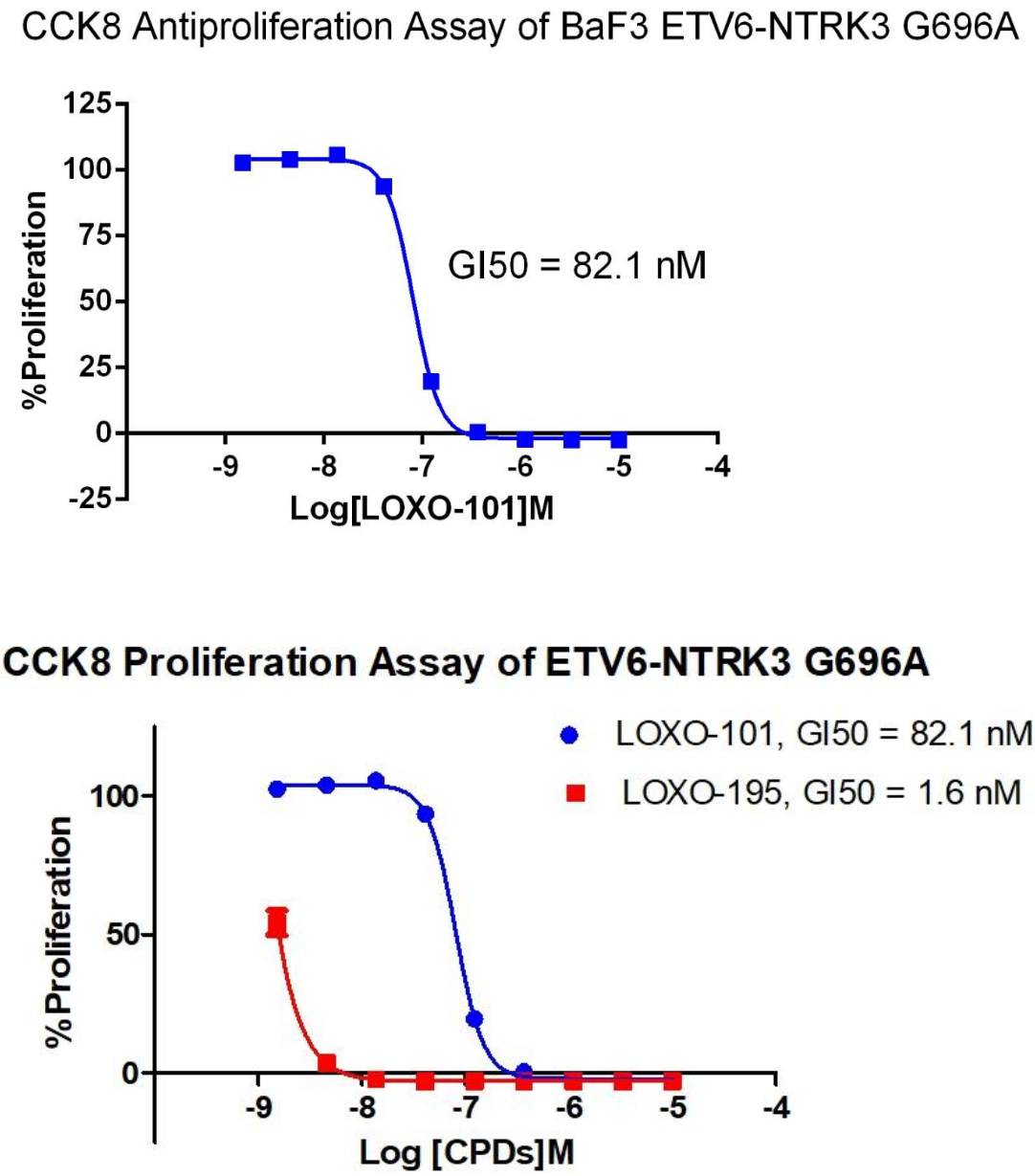

图 3：使用 LOXO-101、LOXO-195 增殖抑制实验结果

7.2 WB 验证结果

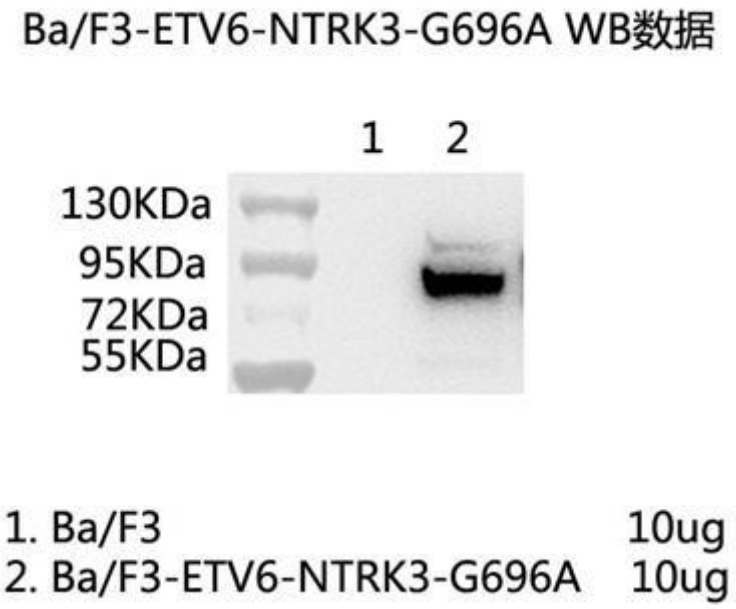

图 4： WB of ETV6-NTRK3-G696A/BaF3 Expression

7.3 Sanger 测序验证结果

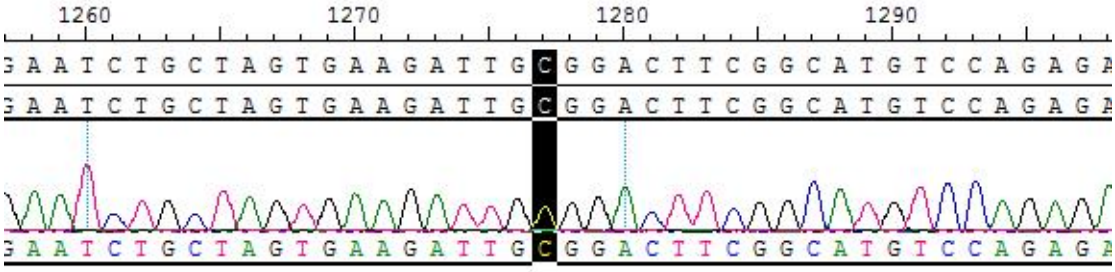

图 5：一代测序验证基因突变（SNP of ETV6-NTRK3 [G696A]/BaF3）

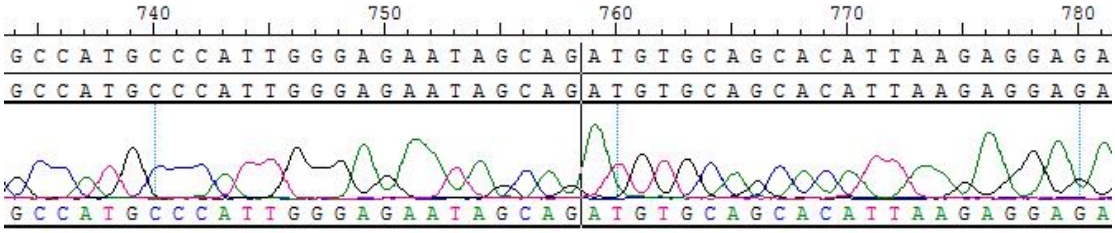

图 6：一代测序验证基因突变（Breakpoint of ETV6-NTRK3-G696A/BaF3）

8. 相关产品

ETV6(Tel)-ARG/BaF3	CBP73010
TEL(ETV6)-JAK2/BaF3	CBP73117
ETV6-NTRK3/BaF3	CBP73194
ETV6-NTRK3 [G623R]/BaF3	CBP73211
ETV6-NTRK3 [G696A]/BaF3	CBP73209