

EZR-ROS1/BaF3

CBP73324

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 Sanger 测序验证结果	5
8. 相关产品	5

1. 背景信息

ROS1 基因是 1982 年于 UR2 禽类肉瘤病毒中发现的具有独特致癌作用的原癌基因，位于 6 号染色体长臂 22.1 位点处，共编码 2347 个氨基酸。ROS1 基因编码的 ROS1 蛋白属于胰岛素受体家族的跨膜酪氨酸激酶受体，该激酶包含一个胞外结构域，一个疏水性的跨膜域和一个胞内羧基末端酪氨酸激酶域。ROS1 参与了包括 RAS-RAF-MEK-ERK (MAPK)，PI3K-AKT-mTOR 在内的多个信号通路的激活。正常细胞中，ROS1 接收外部特定信息后活化，并传递到细胞内部，指导细胞有序地生长和增殖。若 ROS1 基因发生致癌变异，会激活其下游通路的信号，造成细胞过度地生长及增殖，驱动肿瘤的发生。EZR 基因的编码产物为埃兹 (Ezrin) 蛋白，该蛋白在正常胃粘膜及肾脏、肠组织中均有表达，常定位于细胞皱褶、细胞伪足、微绒毛、卵裂沟及收缩环，与细胞骨架重组、细胞生存、粘附、迁移及侵袭有关。EZR-ROS1 基因重排导致激酶持续激活，上调 SHP-1、SHP2 以及 PI3K、AKT、mTOR、MAPK 和 ERK 信号通路，导致细胞持续增殖，肿瘤发生。

2. 产品介绍

科佰生物推出 EZR-ROS1/BaF3 药靶细胞，其通过慢病毒转染的方法引入 EZR-ROS1 基因到 BaF3 细胞系中，稳定表达人突变形态下 EZR-ROS1 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。

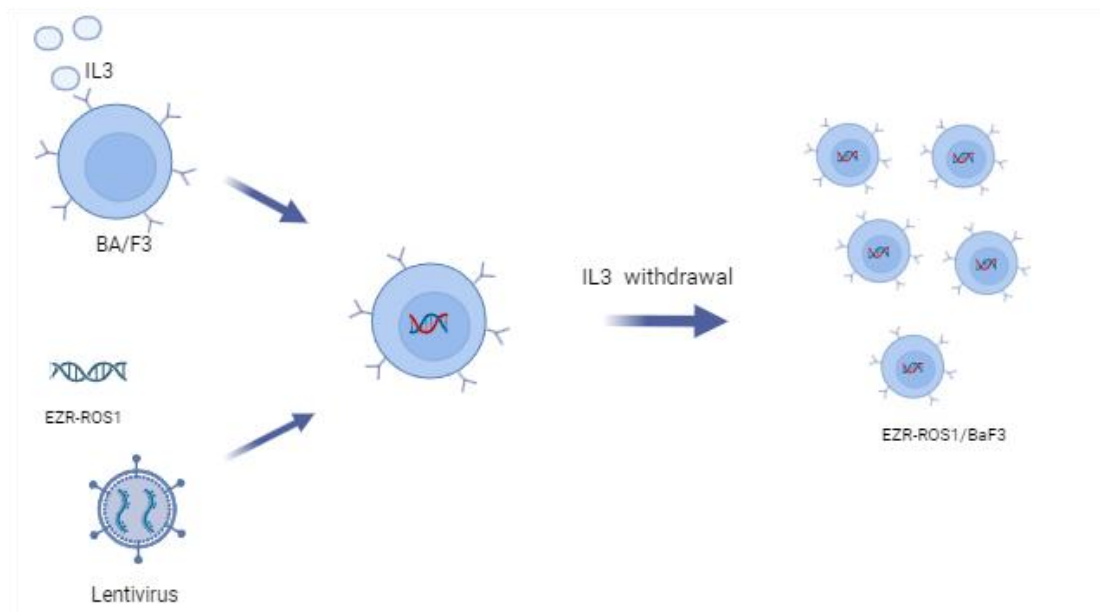


图 1: EZR-ROS1/BaF3 细胞构建流程

3. 细胞基本信息

母细胞: Ba/F3

表达基因: EZR-ROS1

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
EZR-ROS1/BaF3 完全培养基	Cobioer	CBP73324M
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 EZR-ROS1/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 EZR-ROS1 /BaF3 细胞,Cat. # CBP73324 开展，本实验使用 Crizotinib、Lorlatinib、Repotrectinib 为测试样本，验证本模型的生物功能。

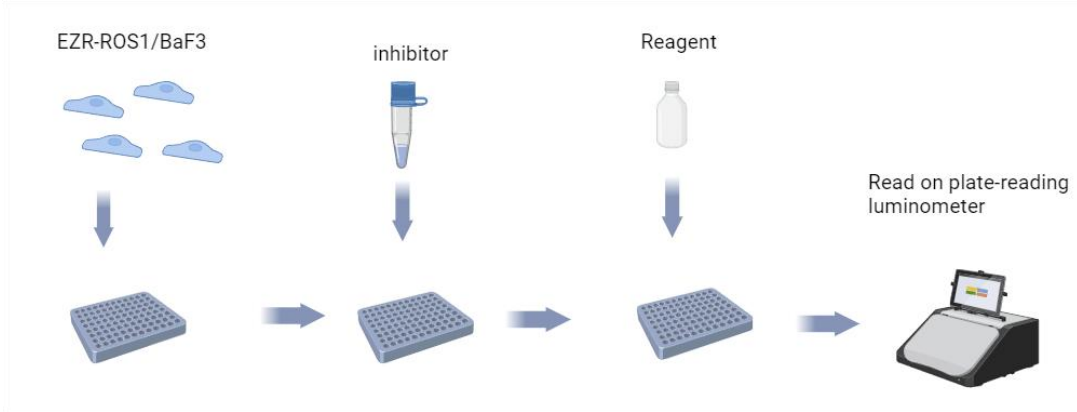


图 2: EZR-ROS1/BaF3 增殖抑制实验流程示意图

- 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，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：
$$\text{Proliferation\%} = \frac{(\text{待测化合物孔 G3} - \text{G0 平均值})}{(\text{DMSO 对照孔 G3 平均值} - \text{G0 平均值})} * 100$$
。
- 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

CTG Proliferation Assay of BaF3 EZR-ROS1 (C5)

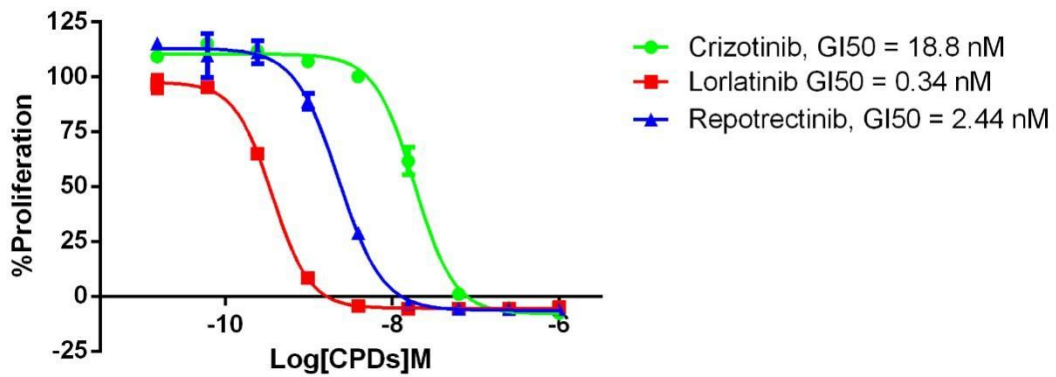


图 3: 使用 Crizotinib、Lorlatinib、Repotrectinib 增殖抑制实验结果

7.2 Sanger 测序验证结果

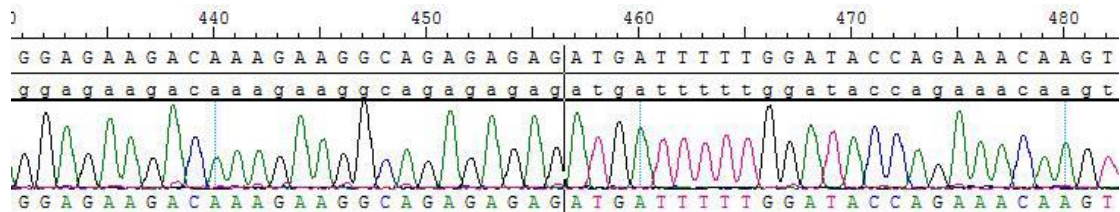


图 4: 一代测序验证基因突变 (EZR-ROS1/BaF3)

8. 相关产品

CD74-ROS1/BaF3	CBP73331
EZR-ROS1/BaF3	CBP73324