FLT3-ITD [D835V]/BaF3

CBP73097

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 4
    7.1 增殖抑制实验验证结果 5
8. 相关产品 5

1. 背景信息

FLT3 基因位于染色体 13q12，包含 24 个外显子，编码 993 个氨基酸，属于Ⅲ型受体酪氨酸激酶（RTK）受体亚家族。FLT3 由胞外五个免疫球蛋白样结构域、一个并列膜（JM）结构域、一个由激酶插入结构域及其酪氨酸激酶（TK）结构域组成，以及细胞内区域的 C 端结构域。 FLT3 蛋白与膜外配体结合后，其胞浆内的激酶区形成同源二聚体，导致自身磷酸化。活化的 FLT3 蛋白可使多种胞浆的效应分子活化和磷酸化，参与骨髓造血细胞的凋亡、增殖和分化。ITD（内部串联重复）突变是 FLT3 最常见的一类突变，是指在 FLT3 基因近膜结构域插入了一段重复序列，通常发生在近膜区的精氨酸残基 595 附近，位于基因的 14/15 号外显子上，插入的位点和序列多种多样，长度一般 3-400bp 不等，它总是以三倍的倍数出现，保留了转录本的阅读框（ORF）。插入的重复序列导致 FLT3 在无配体结合的情况下发生二聚体化并持续自我磷酸化，导致自身抑制功能丧失，增强激活酪氨酸激酶活性，使得下游信号通路（RAS/MAPK、PI3K/AKT 等）持续激活，导致细胞增殖失调，促进 AML 疾病的复发等。FLT3 的异常激活与多种肿瘤有关，其突变主要见于髓系肿瘤，如急性髓性白血病（AML）和骨髓增生异常综合征（MDS）。FLT3-ITD 突变多为插入突变，成人 AML 中也存在缺失或缺失/插入突变，且不同 AML 患者骨髓单个核细胞存在不同的 FLT3-ITD 突变比例、数量和长短。

2. 产品介绍

科佰生物推出 FLT3-ITD [D835V]/BaF3 药靶细胞，其通过慢病毒转染的方法引入 D835V 突变状态的 FLT3-ITD 基因到 BaF3 细胞系中，稳定表达人突变形态下的 FLT3-ITD [D835V]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。

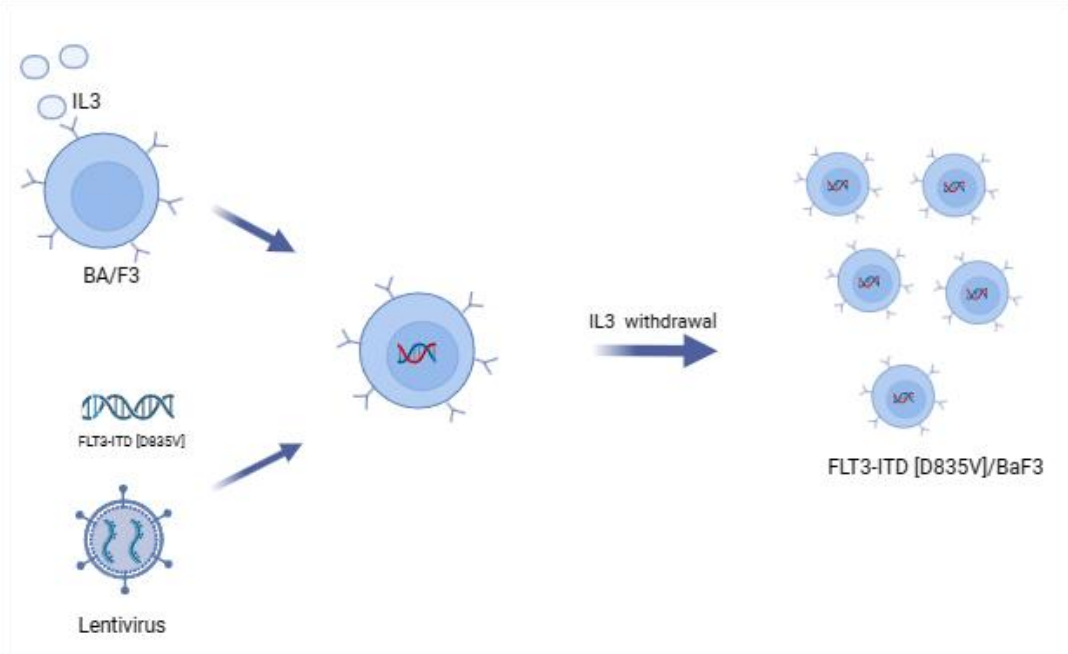

图 1: FLT3-ITD [D835V]/BaF3 细胞构建流程

3. 细胞基本信息

母细胞: Ba/F3

表达基因: FLT3-ITD [D835V]

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
FLT3-ITD [D835V]/BaF3 完全培养基	Cobioer	CBP73097M
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

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 FLT3-ITD [D835V]/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 FLT3-ITD [D835V] /BaF3 细胞,Cat. # CBP73097 开展，本实验使用 Sorafinib、Sunitinib 为测试样本，验证本模型的生物功能。

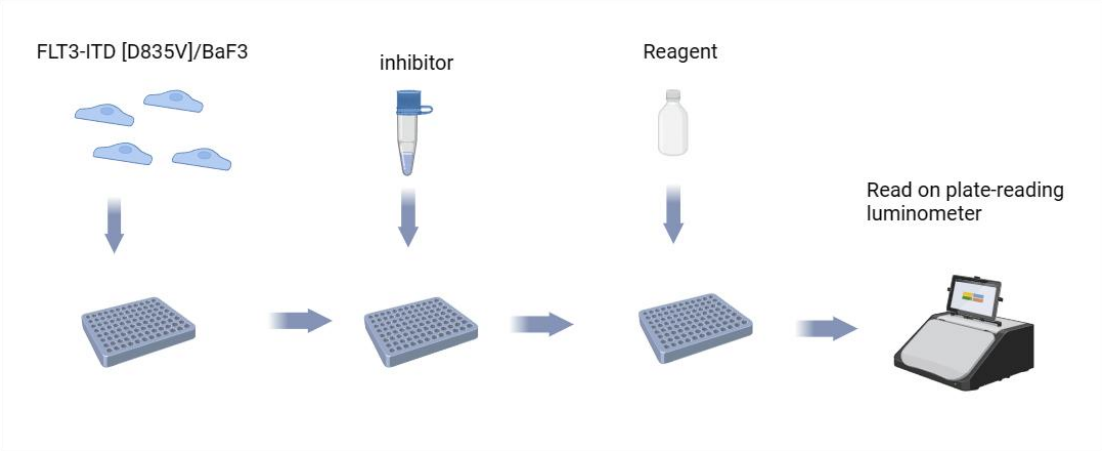

图 2: FLT3-ITD [D835V]/BaF3 增殖抑制实验流程示意图

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

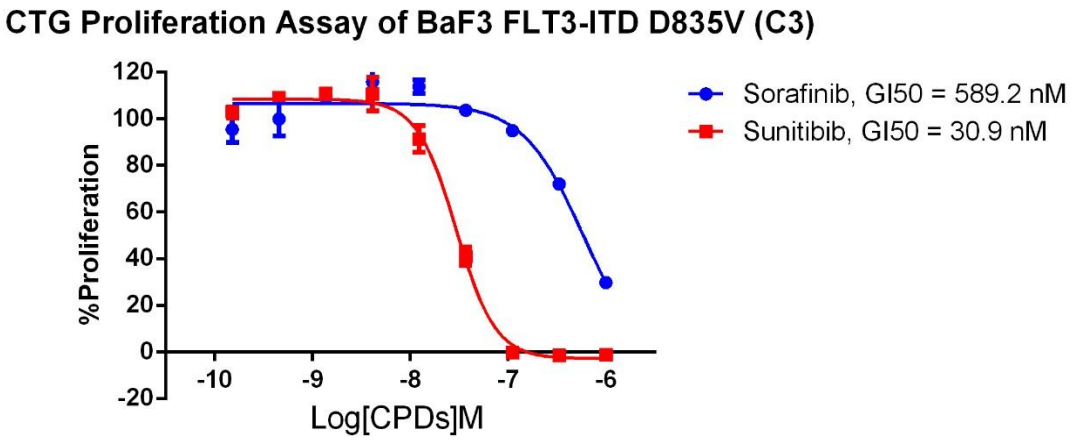

图 3：使用 Sorafinib、Sunitinib 增殖抑制实验结果

8. 相关产品

名称	货号
FLT3-ITD/BaF3	CBP73096
FLT3-ITD [D835V]/BaF3	CBP73097
FLT3-ITD [D835Y]/BaF3	CBP73098
FLT3-ITD [D835H]/BaF3	CBP73239
FLT3-ITD [D835E]/BaF3	CBP73240
FLT3-ITD [D835del]/BaF3	CBP73241
FLT3-ITD [N676K]/BaF3	CBP73242
FLT3-ITD [I836del]/BaF3	CBP73243
FLT3-ITD [F691L]/BaF3	CBP73099
FLT3-ITD [Y842C]/BaF3	CBP73100