

# JAK2 V617F/BaF3

## CBP73246

# 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

JAK2(Janus 激酶 2)是 JAK 家族 4 个成员(TYK2、JAK1、JAK2、JAK3)中的一员, 为非受体型酪氨酸激酶(PTK), 位于 9 号染色体短臂(9p24), 在造血调节中起着重要的作用。JAK2 蛋白由 1132 个氨基酸残基组成,有 7 个 JAK 同源结构域(JAK homology domain,JH),从 C 端至 N 端依次为 JH1~JH7。JH1 位于 c 端(残基 836~1132),为具有酪氨酸激酶活性的主要催化结构域;JH2 为假激酶结构域(残基 543~824),起到负调节 JH1 激酶活性的作用,且在其功能活性状态下,可自动磷酸化几个重要的负调节残基;JH5~JH7 位于 N 端,称为 FERM 区域,而 FERM 结构域是促红细胞生成素受体可以与细胞因子特异性结合,并可影响激酶结构域的活性。JAK2 通过 JAKs-STATs 信号通路介导了细胞因子的细胞内信号转导。在正常情况下,JAKs-STATs 通路的活化受到严格调控, 在髓系祖细胞以及红细胞生成过程中起促进或调节细胞增殖,凋亡及血管新生作用;而 JAKs 突变则可导致 JAKs-STATs 通路的异常活化,使细胞持续增殖,凋亡减少,与一些肿瘤尤其是血液系统肿瘤的发生密切相关。研究表明,在多种恶性血液病中均有 JAK2-STATs 信号通路的异常活化,如急性淋巴细胞白血病,急性髓细胞白血病,慢性髓细胞白血病,淋巴瘤骨髓增生异常综合征,MPN。

## 2. 产品介绍

科佰生物推出 JAK2 V617F/BaF3 药靶细胞, 其通过慢病毒转染的方法引入 V617F 状态的 JAK2 基因到 BaF3 细胞系中, 稳定表达人突变形态下 JAK2 V617F 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。

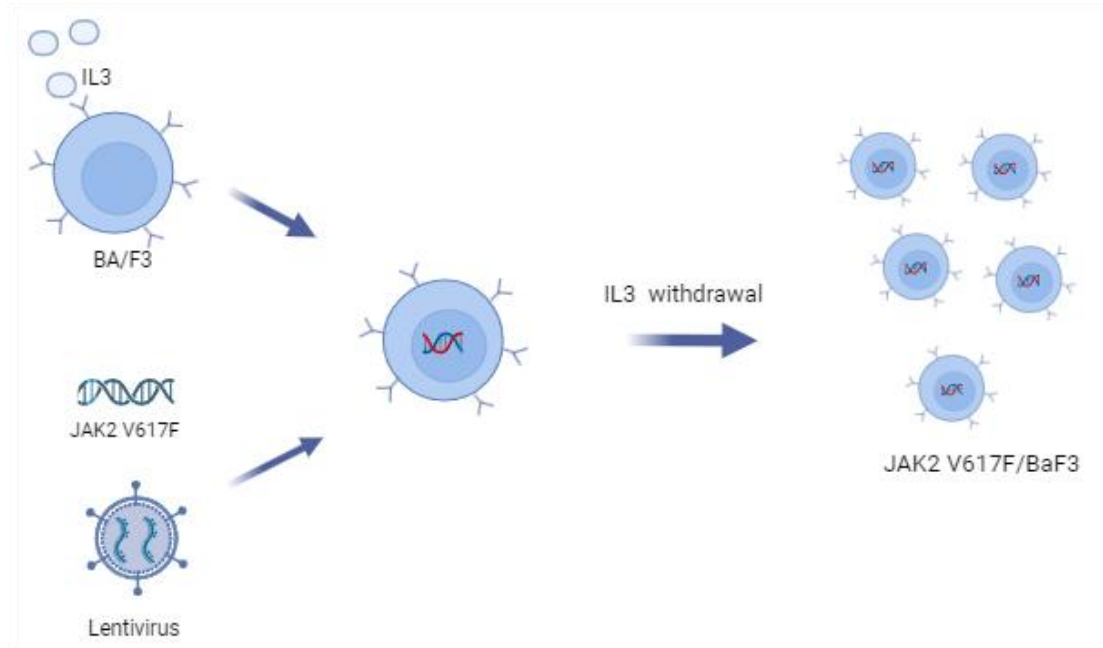


图 1: JAK2 V617F/BaF3 细胞构建流程

### 3. 细胞基本信息

母细胞: Ba/F3

表达基因: JAK2 V617F

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
JAK2 V617F/BaF3 完全培养基	Cobioer	CBP73246M
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 JAK2 V617F/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% CO<sub>2</sub> 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  $2 \times 10^6$  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  $8 \times 10^6$  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 JAK2 V617F/BaF3 细胞,Cat. # CBP73246 开展，本实验使用 CHZ868、Fedratinib、Ruxolitinib 为测试样本，验证本模型的生物功能。

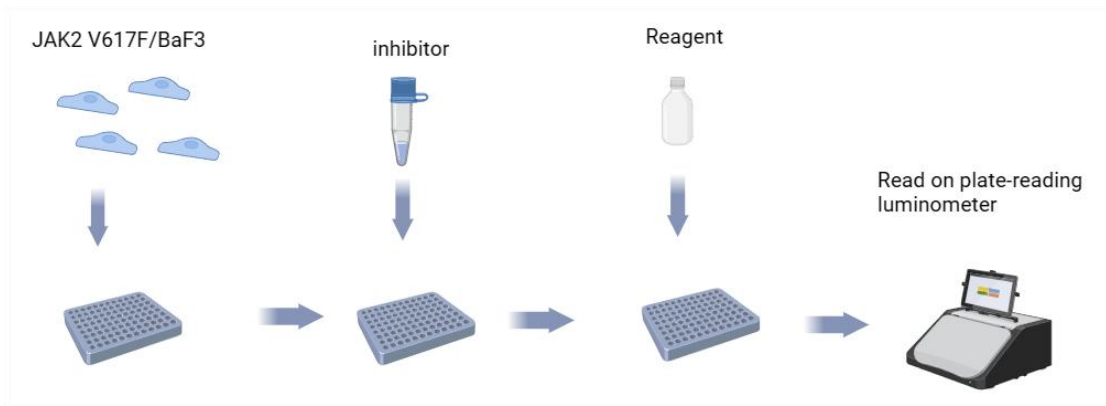


图 2: JAK2 V617F/BaF3 增殖抑制实验流程示意图

- 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 JAK2 V617F (C5)

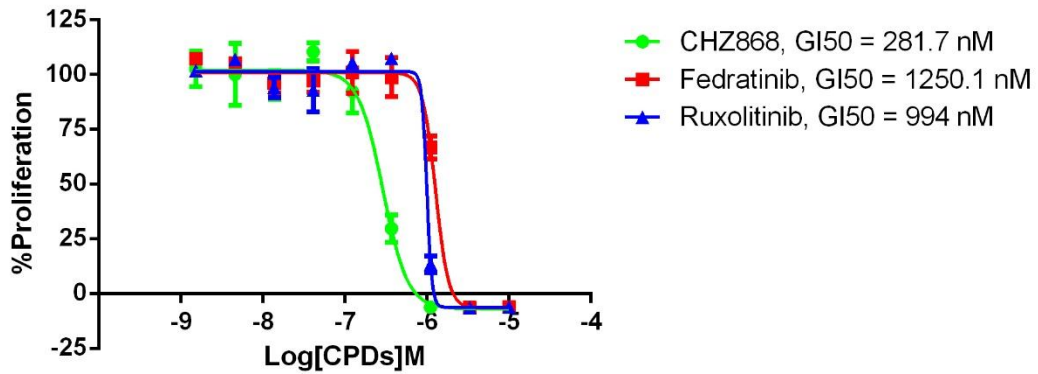


图 3: 使用 CHZ868、Fedratinib、Ruxolitinib 增殖抑制实验结果

### 7.2 Sanger 测序验证结果

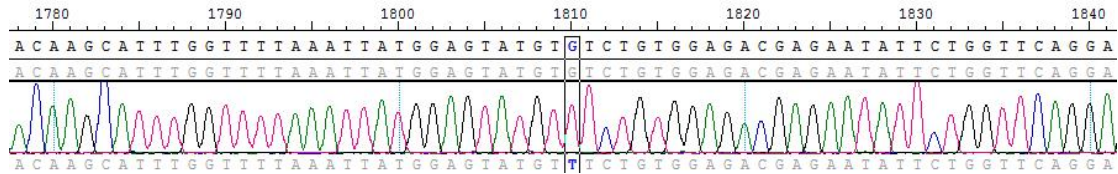


图 4: 一代测序验证基因突变 (V617F)

## 8. 相关产品

TEL(ETV6)-JAK2/BaF3	CBP73117
JAK2 V617F/BaF3	CBP73246