KIF5B(E15)-RET (E12)[V804M]/BaF3

CBP73196

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 WB 验证结果 5
   7.3 Sanger 测序验证结果 6
8. 相关产品 6

1. 背景信息

RET 基因位于 10 号常染色体长臂(10q11.2)，全长 60kb，包含 21 个外显子，至少有 4 个转录产物，编码 1100 个氨基酸的酪氨酸激酶受体超家族 RET 蛋白。RET 蛋白是一种受体酪氨酸激酶，其包含胞外受体结合区、跨膜区以及胞内结合区构成。跨膜蛋白分为三个部分:蛋白的一端位于细胞外，一部分位于细胞膜中，另一端则位于细胞内。当 RET 蛋白与其配体—细胞外信号分子家族的胶质细胞源神经营养因子(GDNF)结合时，其将引起 RET 蛋白受体的磷酸化并使 RET 进入激活状态，被激活的 RET 产生二聚化并磷酸化其底物，造成下游信号通路的激活。KIF5B 基因位于 10 号染色体 p11.22 区，其表达产物 KIFSB 蛋白为驱动蛋白家族一员，由 9634 个氨基酸组成,主要包括 4 个结构域,即在 ATP 结合和催化水解过程中起重要作用的马达结构域,包括超螺旋部分的二聚化结构域，连接马达结构域和二聚化结构域的颈链以及两条重链和轻链共同构成的尾部。KIF5B 和 RET 分别位于 10p11. 22 和 10q11. 21，相距 10. 6Mb，通过臂间倒位后相融合，形成 KIF5B-RET 融合基因。KIF5B 和 RET 双螺旋 DNA 的融合断点并非完全一致，目前已发现 KIF5B-RET 至少存在 7 种变体。KIF5B-RET 融合蛋白由卷曲螺旋域和蛋白激酶域组成，卷曲螺旋域诱导融合激酶二聚体化，从而使蛋白酪氨酸激酶域自身磷酸化而激活。

2. 产品介绍

科佰生物推出 KIF5B(E15)-RET(E12)[V804M]/BaF3 药靶细胞，其通过慢病毒转染的方法引入 V804M 突变状态的 KIF5B(E15)-RET(E12)基因到 BaF3 细胞系中，稳定表达人突变形态下 KIF5B(E15)-RET(E12) [V804M]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。

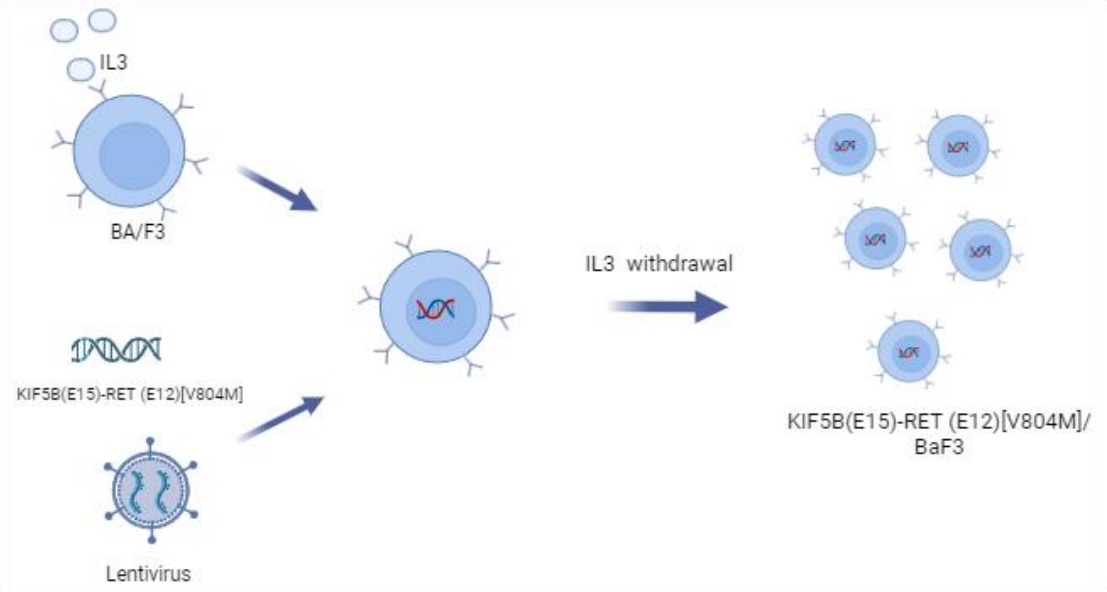

图 1: KIF5B(E15)-RET(E12)[V804M]/BaF3 细胞构建流程

3. 细胞基本信息

母细胞: Ba/F3

表达基因: KIF5B(E15)-RET(E12)[V804M]

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
KIF5B(E15)-RET(E12)[V804M]/BaF3 完全培养基	Cobioer	CBP73196M
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 KIF5B(E15)-RET(E12)[V804M]/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 KIF5B(E15)-RET(E12)[V804M] /BaF3 细胞,Cat. # CBP73196 开展，本实验使用 Cabozantinib、BLU667、LOXO-292 为测试样本，验证本模型的生物功能。

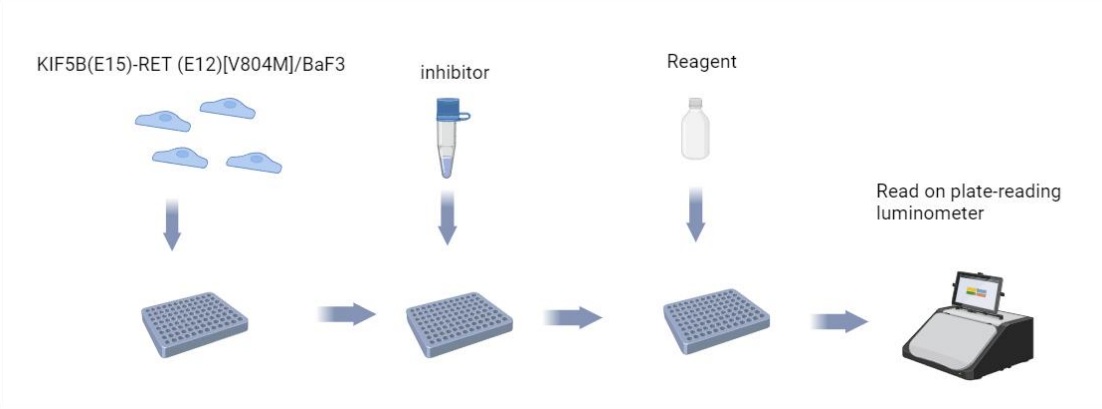

图 2: KIF5B(E15)-RET(E12)[V804M]/BaF3 增殖抑制实验流程示意图

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

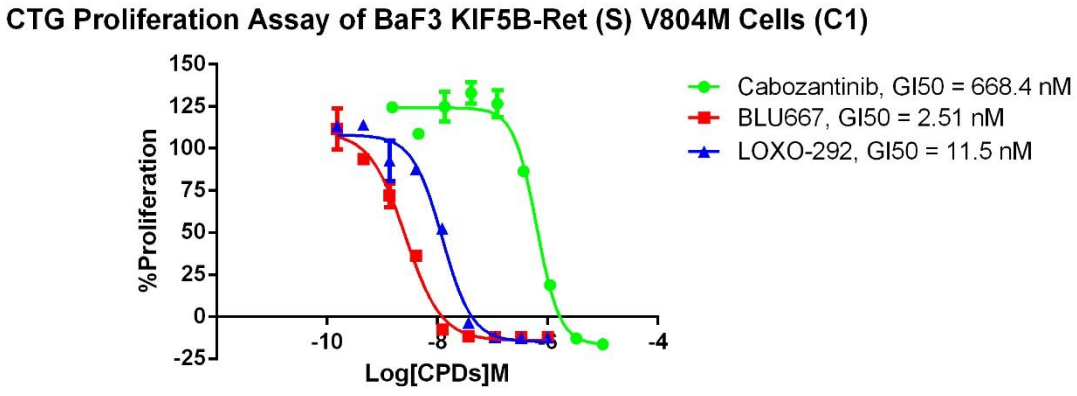

图 3：使用 Cabozantinib、BLU667、LOXO-292 增殖抑制实验结果

7.2 WB 验证结果

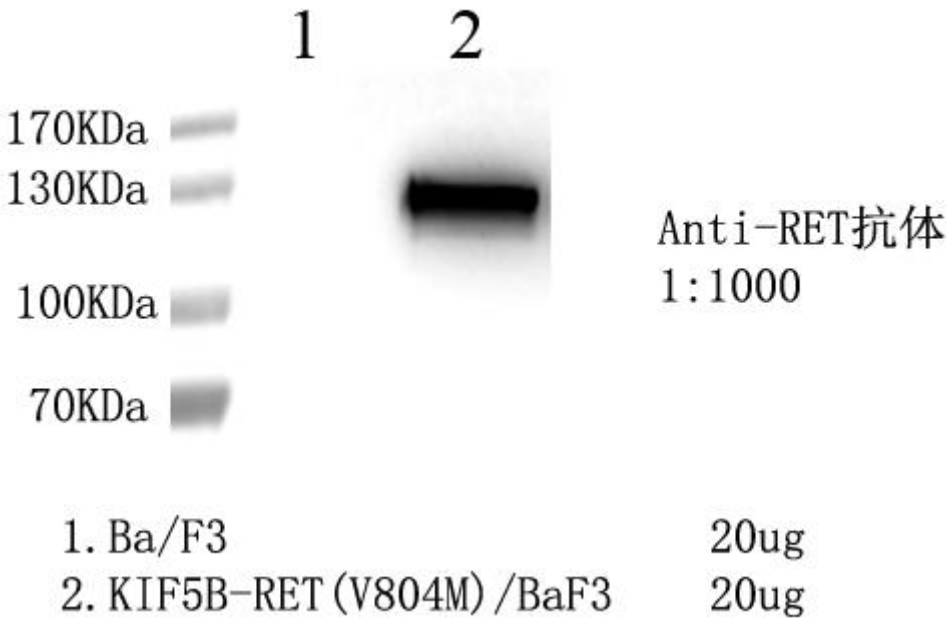

图 4：WB of KIF5B(E15)-RET(E12)[V804M]/BaF3

7.3 Sanger 测序验证结果

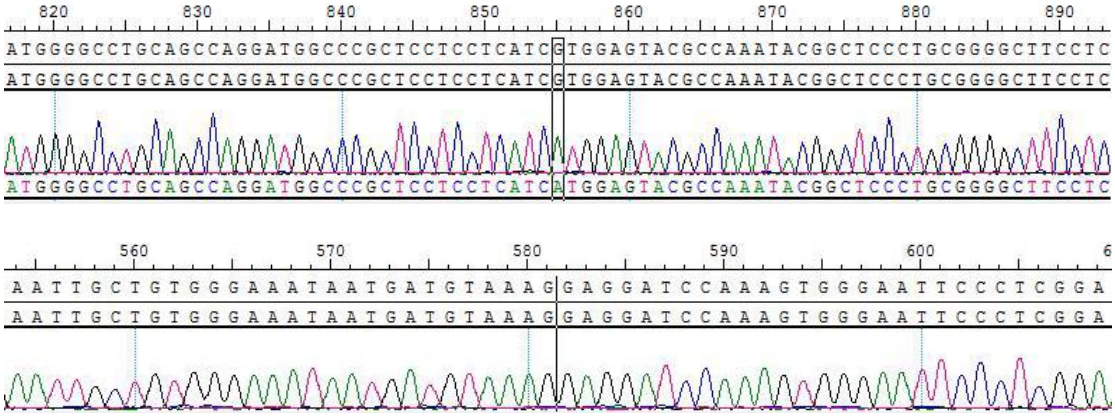

图 5：一代测序验证基因突变（KIF5B-RET [V804M]/BaF3）

8. 相关产品

KIF5B(E15)-RET (E12)-short/BaF3	CBP73205
KIF5B(E15)-RET (E12)[V804E]/BaF3	CBP73197
KIF5B(E15)-RET (E12) [V804L]/BaF3	CBP73198
KIF5B(E15)-RET (E12)[V804M]/BaF3	CBP73196
KIF5B(E15)-RET (E12)[G810R]/BaF3	CBP73231
KIF5B(E15)-RET (E12)-long/BaF3	CBP73195