KRAS G12C-Q99L/BaF3

CBP73374

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

KRAS 基因编码一种 GTPase 膜结合蛋白，它属于 RAS 超蛋白家族。该蛋白以两种不同的形式存在：非激活状态下 GDP 结合形式和激活状态下 GTP 结合形式。正常的 KRAS 蛋白被上游磷酸化蛋白激活后会短暂活化，与 GTP 结合后水解 GTP 磷酸基生成 GDP，然后失活。当 KRAS 可被生长因子或酪氨酸激酶（如 EGFR）短暂活化，活化后的 KRAS 可以激活下游如控制细胞生成的 PI3K-AKT-mTOR 信号通路，以及控制细胞增殖的 RAS-RAF-MEK-ERK 信号通路，突变的 KRAS 即使无 EGFR 等激酶激活的情况下都会发生持续活化，KRAS 蛋白持续保持与 GTP 结合激活状态，不依赖上级信号的刺激，导致下游 MAPK，PI3K 和 JNK 信号通路异常活跃，细胞持续增殖最终发生癌变。KRAS 突变常出现在肺癌，结直肠癌，胰腺癌中，它也会在胆管癌、宫颈癌、膀胱癌、肝癌和乳腺癌等癌症类型中出现。KRAS 突变主要发生在第 12、13 和 61 位氨基酸，KRAS 激活常见方式是点突变。主要以下几种类型：减少 GTP 水解的突变（G12，Q61 位点）；增加 GTP 加载速率的突变（G13，K117 位点）； 核苷酸交换突变（A146 位点），改变 GDP 和 GTP 稳态平衡。

2. 产品介绍

科佰生物推出 KRAS G12C-Q99L/BaF3 药靶细胞，其通过慢病毒转染的方法引入 G12C-Q99L 突变状态的 KRAS 基因到 BaF3 细胞系中，稳定表达人突变形态下 KRAS G12C-Q99L 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。

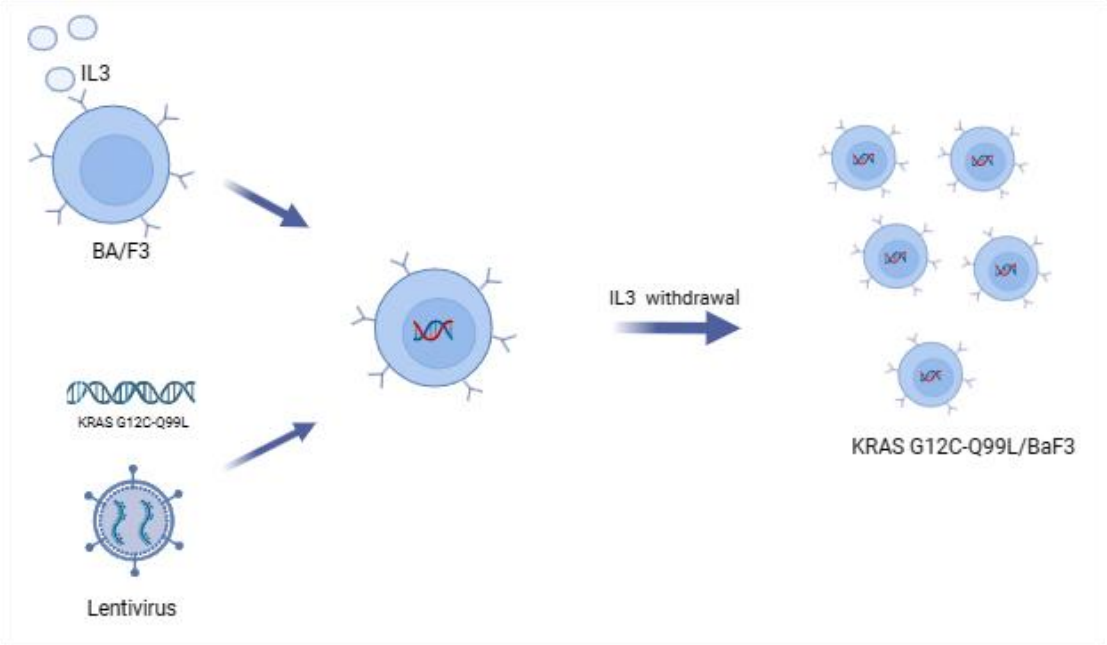

图 1: KRAS G12C-Q99L/BaF3 细胞构建流程

3. 细胞基本信息

母细胞: Ba/F3

表达基因: KRAS G12C-Q99L

传代培养基: RPMI-1640+10%FBS+5ug/ml blasticidin

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
KRAS G12C-Q99L/BaF3 完全培养基	Cobioer	CBP73374M
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 KRAS G12C-Q99L/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 KRAS G12C-Q99L /BaF3 细胞,Cat. # CBP73374 开展，本实验使用 AMG510、MRT-X849 为测试样本，验证本模型的生物功能。

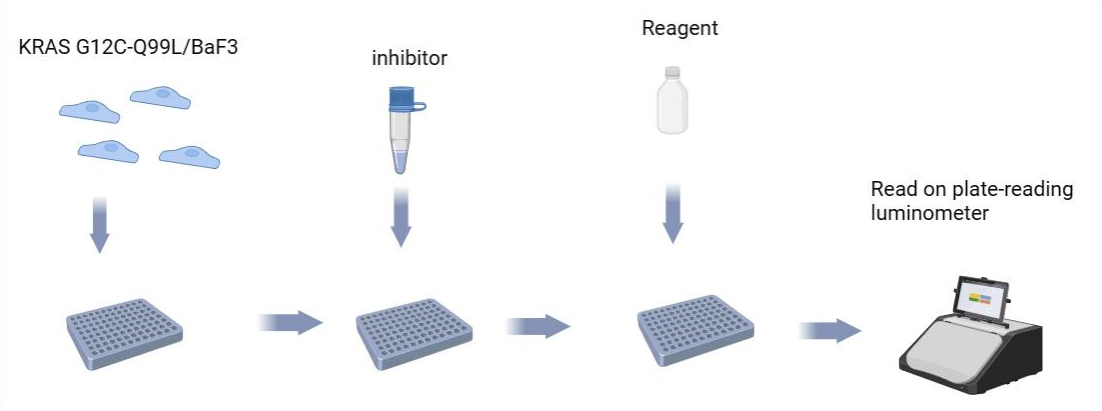

图 2: KRAS G12C-Q99L/BaF3 增殖抑制实验流程示意图

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

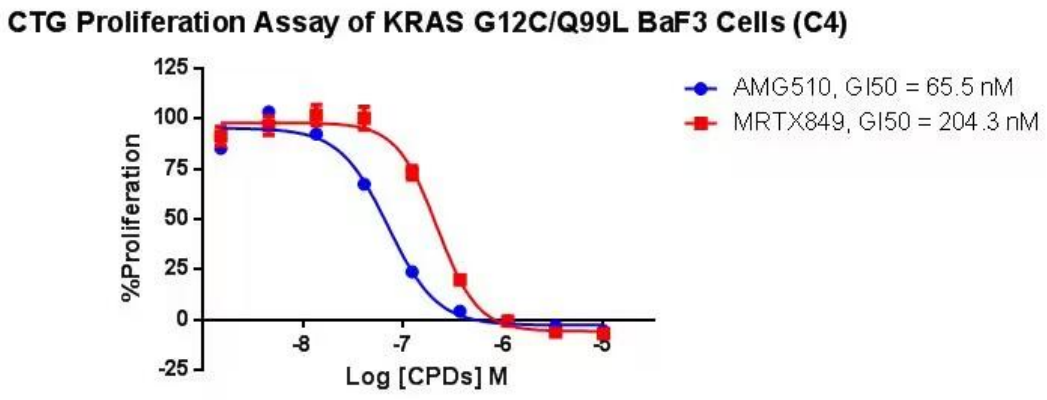

图 3：使用 AMG510、MRT-X849 增殖抑制实验结果

7.2 Sanger 测序验证结果

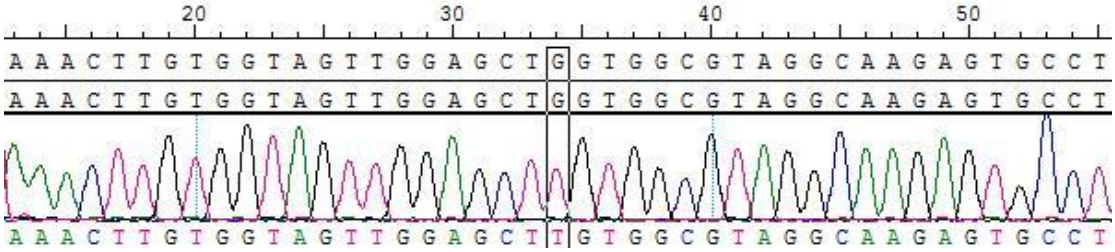

图 4：一代测序验证基因突变（G12C）

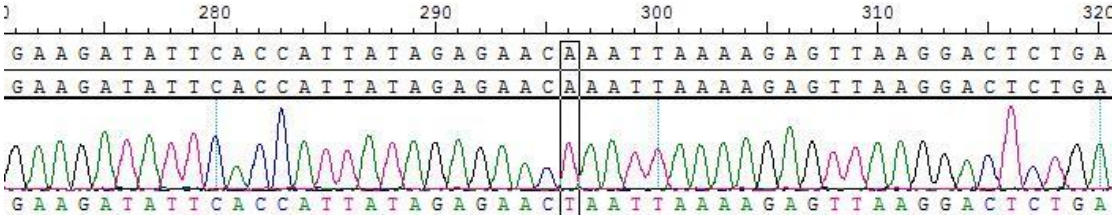

图 5：一代测序验证基因突变（Q99L）

8. 相关产品

名称	货号
KRAS G12C/BaF3	CBP73227

KRAS G12C-A59S/BaF3	CBP73373
KRAS G12C-A59T /BaF3	CBP73380
KRAS G12C-R68M/BaF3	CBP73372
KRAS G12C-R68S/BaF3	CBP73344
KRAS G12C-H95D/BaF3	CBP73338
KRAS G12C-H95Q/BaF3	CBP73345
KRAS G12C-H95R/BaF3	CBP73347
KRAS G12C-Y96C/BaF3	CBP73337
KRAS G12C-Y96D/BaF3	CBP73346
KRAS G12C-Y96S/BaF3	CBP73376
KRAS G12C-Q99L/BaF3	CBP73374
KRAS G12D/BaF3	CBP73228
KRAS G12V/BaF3	CBP73230