

TEL(ETV6)-JAK2/BaF3

CBP73117

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	2
5.1 细胞复苏	2
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
8. 相关产品	6

1. 背景信息

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。TEL-JAK2 融合基因是 TEL 与 PTK 融合的另一融合蛋白,是由 9p24 上的 JAK2 基因易位至 12p13 上的 TEL/ETV6 基因而产生的。该融合蛋白显示结构性磷酸化,使 JAK2 的 PTK 持续性激活,进而激活下游信号转导通路,在白血病的发病机制中起重要的作用,也仅在个别 AML 病例中发生。

2. 产品介绍

科佰生物推出 TEL(ETV6)-JAK2/BaF3 药靶细胞,其通过慢病毒转染的方法引入 TEL (ETV6)-JAK2 基因到 BaF3 细胞系中,稳定表达人突变形态下 TEL(ETV6)-JAK2 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。

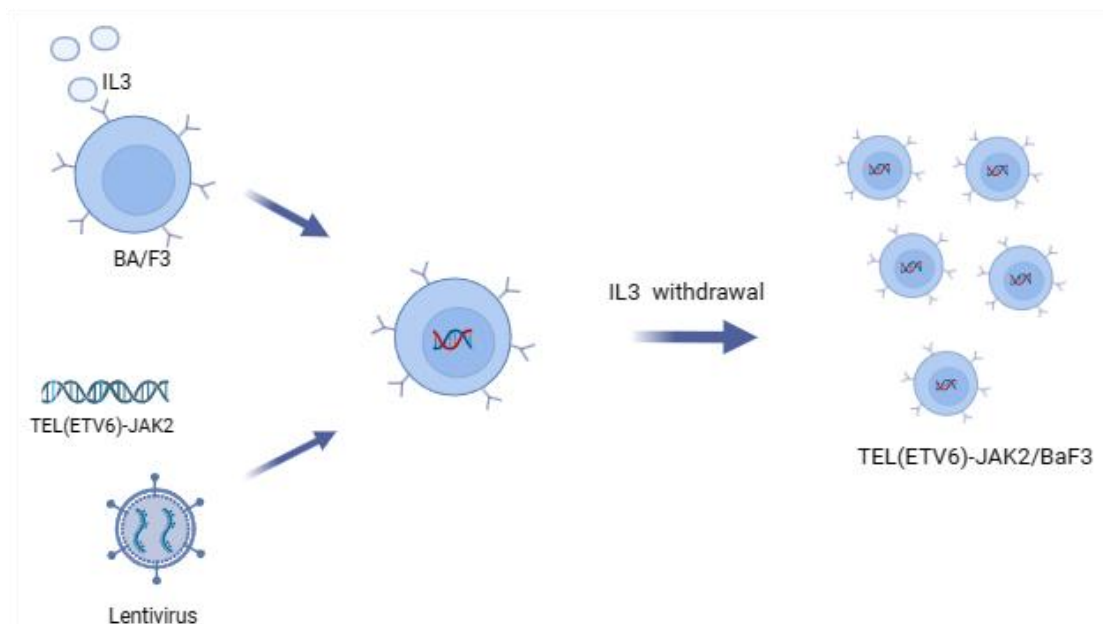


图 1: TEL(ETV6)-JAK2/BaF3 细胞构建流程

3. 细胞基本信息

母细胞: Ba/F3

表达基因: TEL(ETV6)-JAK2

传代培养基: RPMI-1640+10%FBS+2ug/ml puromycin

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
TEL(ETV6)-JAK2/BaF3 完全培养基	Cobioer	CBP73117M
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 TEL(ETV6)-JAK2/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 3×10^5 - 2×10^6 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 TEL(ETV6)-JAK2/BaF3 细胞,Cat. # CBP73117 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。

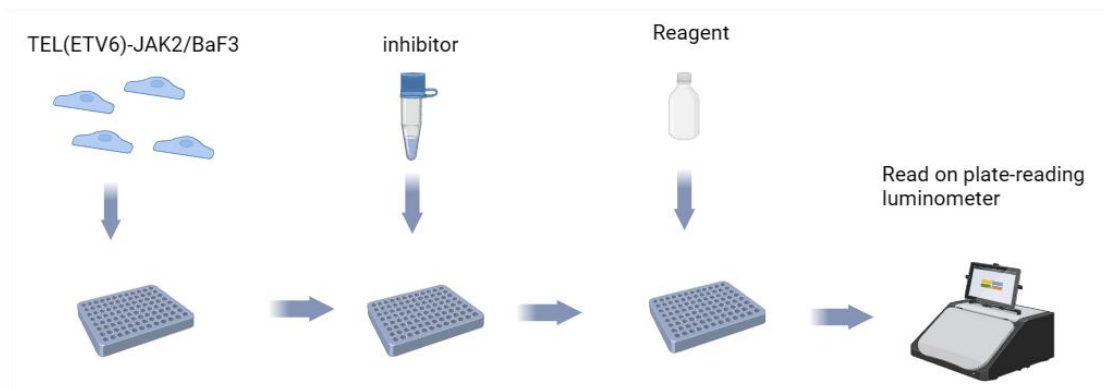


图 2: TEL(ETV6)-JAK2/BaF3 增殖抑制实验流程示意图

- 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 5×10^4 /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： $\text{Proliferation\%} = (\text{待测化合物孔 G3} - \text{G0 平均值}) / (\text{DMSO 对照孔 G3 平均值} - \text{G0 平均值}) * 100$ 。
- 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 TEL-JAK2 (C1)

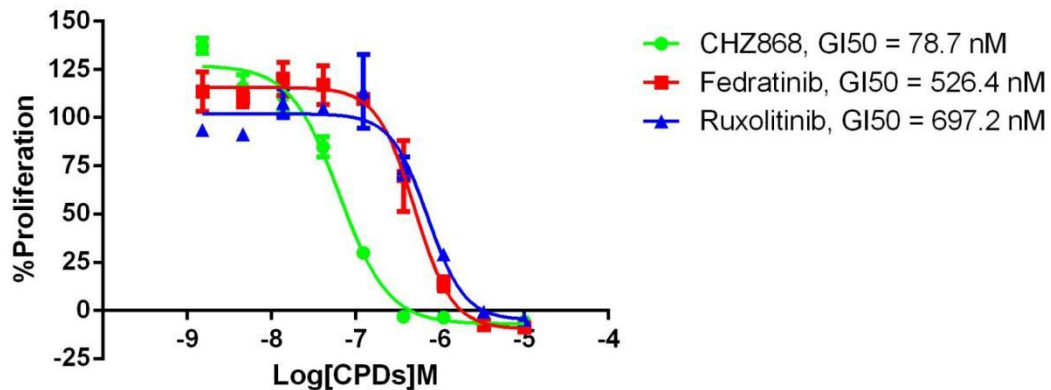


图 3: 使用 CHZ868、Fedratinib、Ruxolitinib 增殖抑制实验结果

7.2 WB 验证结果

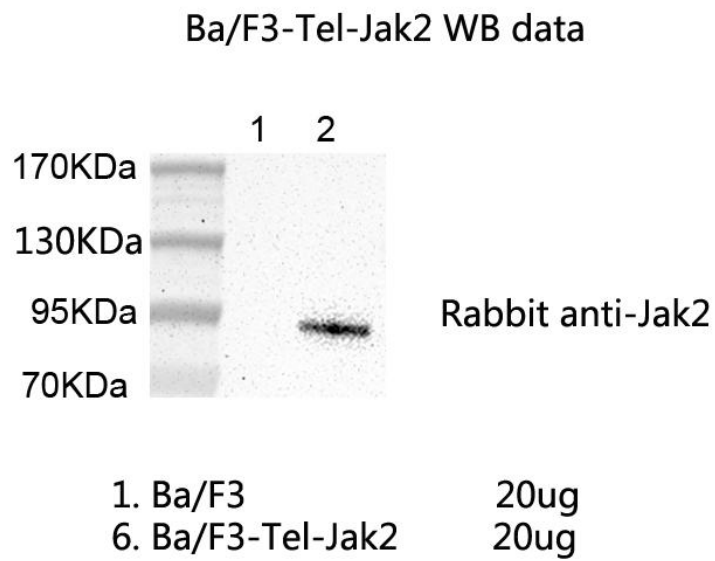


图 4: WB of BA/F3/TEL(ETV6)-JAK2

8. 相关产品

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