

TPM3-NTRK1/BaF3

CBP73203

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
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

NTRK1 基因定位于染色体 1q21 - q22 上，其编码蛋白 TRKA 与神经生长因子（NGF）结合，从而诱导 TRKA 的酪氨酸磷酸化和酪氨酸激酶活性。TRKA 为跨膜蛋白，其胞外部分包含 5 个结构域，其中有两个胱氨酸富集区（Cysteinerich）C1 和 C2；C1 和 C2 之间是亮氨酸富集区 LRR；C3 与跨膜区域之间有两个免疫球蛋白类似结构域 Ig1 和 Ig2，其中 Ig2 为配体特异性识别的位点。TRKA 的胞内部分主要为一个激酶催化结构域 KD。TRKA 的胞内部分有多个磷酸化位点，当 TRKA 二聚化之后会发生自磷酸化，先是 Y676、Y680、Y681 等位点发生磷酸化，上述位点的磷酸化又会使 Y496、Y791 两个位点发生磷酸化，从而激活 TRK 的激活活性。原肌球蛋白 3（TPM3）的基因位于 1 号染色体的长臂 2 区第 1 条带第 3 亚带（1q21.3）位置，主要由 1 个外显子组成。它可以编码成纤维细胞（含有 284 个氨基酸残基），以及慢收缩骨骼肌（含 284 个氨基酸残基），TPM3 参与细胞骨架微丝的稳定。当位于 1 号染色体长臂上的原肌球蛋白-3 基因 TPM3 与 NTRK1 发生基因片段重排，TPM3 在第 7 号和 8 号外显子之间断裂，NTRK1 在第 8 号外显子内部断裂，然后，TPM3 直接和表达胞内结构区域的 NTRK1 连接，异常表达 TPM3-TRKA 嵌合蛋白。这种基因的改变破坏了细胞中配体 NGF 与 TrkA 的相互作用，胞内 TRKA 处于过度表达和持续激活状态，而下游的 PI3K/AKT、RAS/MAPK 和 PLC γ 三条信号通路也处于异常活跃状态，从而驱动癌症的发生。TPM3 和 NTRK1 基因融合常见于婴儿纤维肉瘤、甲状腺肿瘤、结肠肿瘤、肺肿瘤、黑色素瘤、胃肠道间质瘤等 17 种肿瘤。

2. 产品介绍

科佰生物推出 TPM3-NTRK1/BaF3 药靶细胞，其通过慢病毒转染的方法引入突变状态的 TPM3-NTRK1 基因到 BaF3 细胞系中，稳定表达人突变形态下的 TPM3-NTRK1 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。

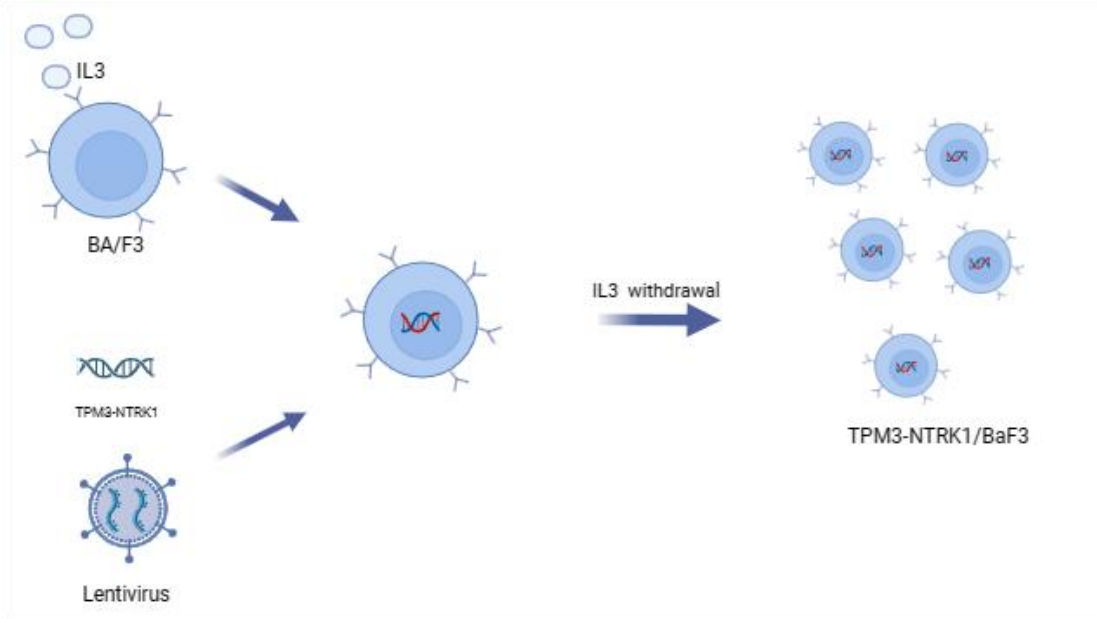


图 1: TPM3-NTRK1/BaF3 细胞构建流程

3. 细胞基本信息

母细胞: Ba/F3

表达基因: TPM3-NTRK1

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
TPM3-NTRK1/BaF3 完全培养基	Cobioer	CBP73203M
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 TPM3-NTRK1/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 $3 \times 10^5 - 2 \times 10^6$ 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 TPM3-NTRK1/BaF3 细胞,Cat. # CBP73203 开展，本实验使用 Cabozantinib、LOXO-101 为测试样本，验证本模型的生物功能。

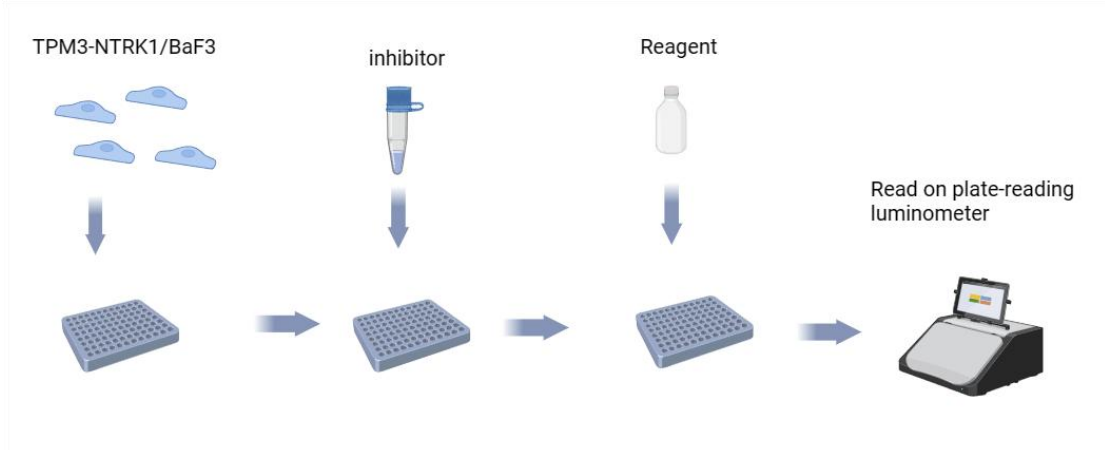


图 2: TPM3-NTRK1/BaF3 增殖抑制实验流程示意图

- 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：
$$\text{Proliferation\%} = \frac{(\text{待测化合物孔 G3} - \text{G0 平均值})}{(\text{DMSO 对照孔 G3 平均值} - \text{G0 平均值})} * 100$$
- 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

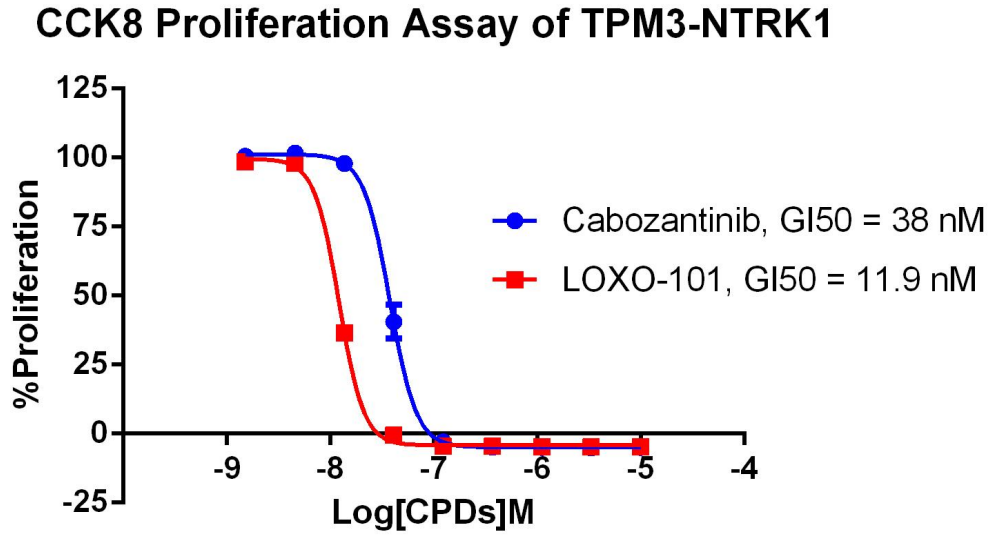


图 3: 使用 Cabozantinib、LOXO-101 增殖抑制实验结果

7.2 WB 验证结果

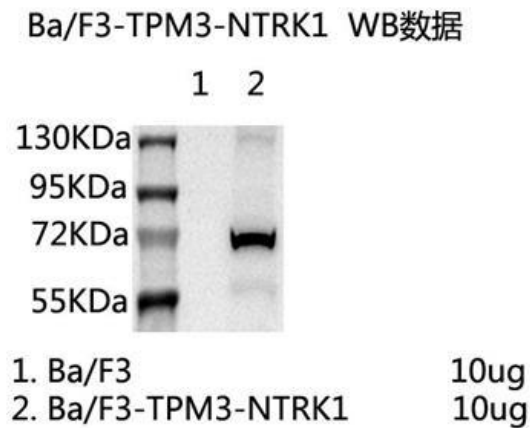


图 4: WB of TPM3-NTRK1/BaF3 Expression

7.3 Sanger 测序验证结果

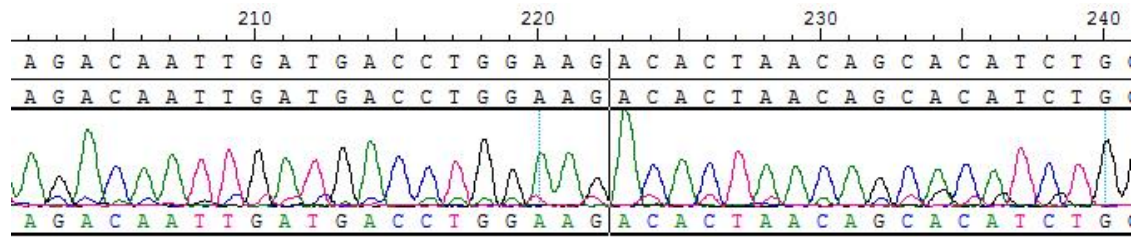


图 5：一代测序验证基因突变（TPM3-NTRK1）

8. 相关产品

名称	货号
TPM3-NTRK1/BaF3	CBP73203
TPM3-NTRK1 [G595R]/BaF3	CBP73225
TPM3-NTRK1 [G667C]/BaF3	CBP73210
TPM3-NTRK1 [F589L]/BaF3	CBP73259
TPM3-NTRK1 [V573M]/BaF3	CBP73260