

TPOR (Ligand Dependent)/BaF3 CBP73266 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 WB 验证结果	5
8. 相关产品	6

1. 背景信息

MPL 基因定位于染色体 1q34，是骨髓增生性白血病病毒（MPLV）的 v-Mpl 的同源对应物，属于造血因子受体超家族，该基因由 12 个外显子和 11 个内含子组成，编码血小板生成素受体（TPOR），是一种含有 625 个氨基酸的跨膜蛋白质受体，即 CD110。MPL 第 1 号外显子编码信号肽，第 2~9 号外显子编码胞外区，第 10 号外显子编码跨膜区，第 11~12 号外显子编码胞内区。MPL 生理情况下可表达于 CD34+ 细胞、巨核细胞和成熟血小板，主要通过血小板生成素（TPO）/TPOR 信号系统发挥作用，TPO 和 TPOR 结合使胞内区同源二聚体的 2 个亚体相互靠近，诱导 JAK2 与 MPL 胞内区的 BOX2 结合，促使 JAK2 聚集并磷酸化，MPL 胞内区酪氨酸残基磷酸化，并激活反向信号通路，包括 JAK-STAT-CrkI、SHP2-Bad、SHC-MAPK 和 PLC-PKC 等。TPOR 的跨膜和胞质结构域边界为一个独特的两亲性 RWQFP 基序，正常情况下由位于该基序的色氨酸 W515，通过增加螺旋倾斜角抑制上游 TPOR 跨膜结构域螺旋的二聚阻止受体的自激活。然而突变导致了 TPOR 的自激活，引起胞内 JAK2 通路活化，从而导致细胞因子非依赖性增殖。

2. 产品介绍

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

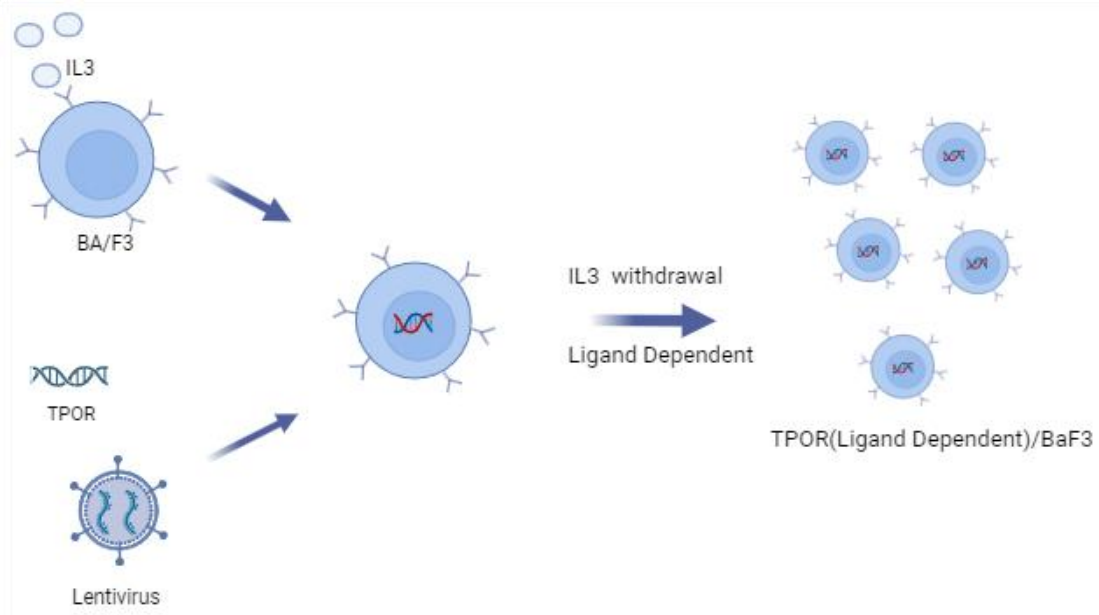


图 1: TPOR (Ligand Dependent)/BaF3 细胞构建流程

3. 细胞基本信息

母细胞: Ba/F3

表达基因: TPOR (Ligand Dependent)

传代培养基: RPMI-1640+10%FBS+2ug/ml puromycin+500nM Eltrombopag

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
TPOR (Ligand Dependent)/BaF3 完全培养基	Cobioer	CBP73266M
Eltrombopag	Selleck	S4502
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 TPOR (Ligand Dependent)/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 TPOR (Ligand Dependent)/BaF3 细胞,Cat. # CBP73266 开展，本实验使用 Eltrombopag 为测试样本，验证本模型的生物功能。

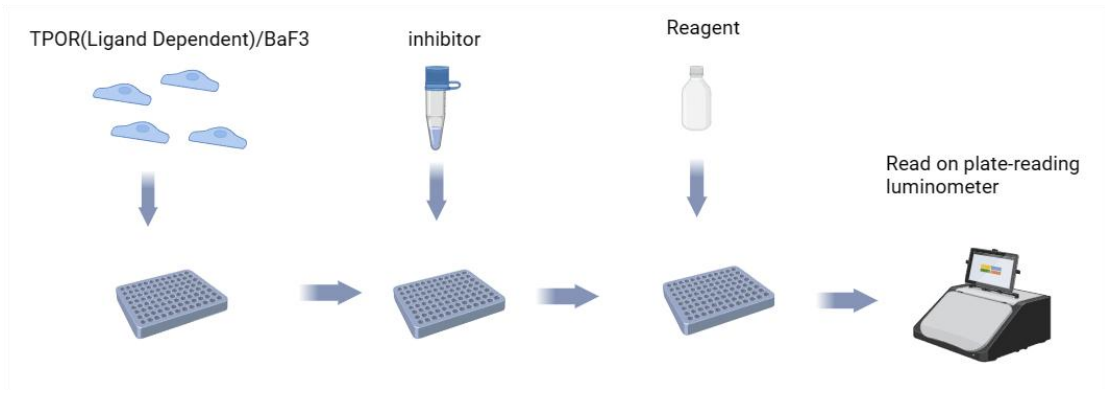


图 2: TPOR (Ligand Dependent)/BaF3 增殖抑制实验流程示意图

- 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。
- 3) 然后加入梯度稀释的 10^* 浓度 Eltrombopag 11.1 ul/孔，从 3uM (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，另外设置最高浓度 3 uM 的 Eltrombopag 阳性对照孔，继续在 37°C 细胞培养箱培养 72 小时。
- 4) 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。
- 5) 根据以下公式计算每个孔对应的细胞增殖率：
$$\text{Proliferation\%} = \frac{(\text{待测化合物孔 G3} - \text{DMSO G3 平均值})}{(\text{Eltrombopag 阳性对照孔 G3 平均值} - \text{DMSO G3 平均值})} * 100$$
- 6) 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 EC50 (EC50 定义为细胞增殖率为 50% 时对应的 Eltrombopag 浓度)。

7. 数据展示

7.1 增殖抑制实验验证结果

CTG Proliferation Assay of BaF3 TPOR Cells (C3)

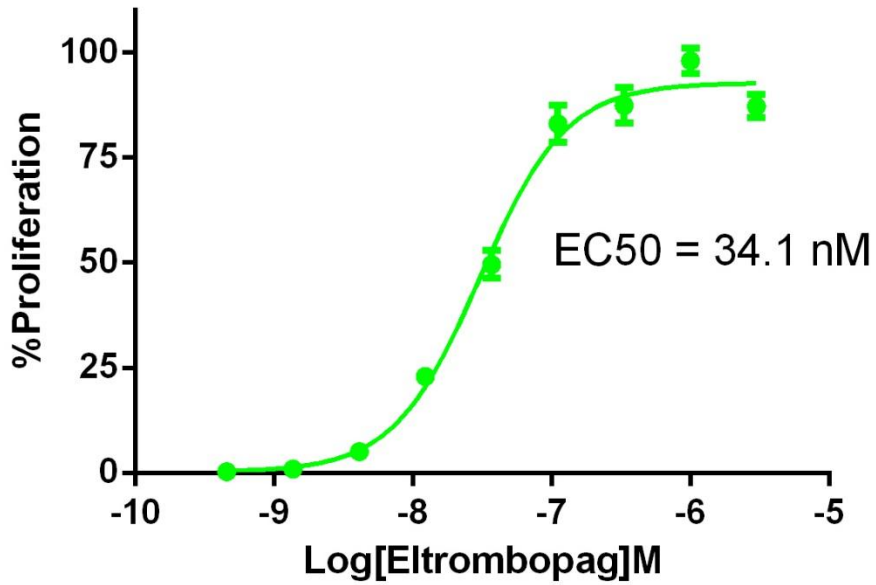


图 3: 使用 Eltrombopag 增殖实验结果

7.2 WB 验证结果

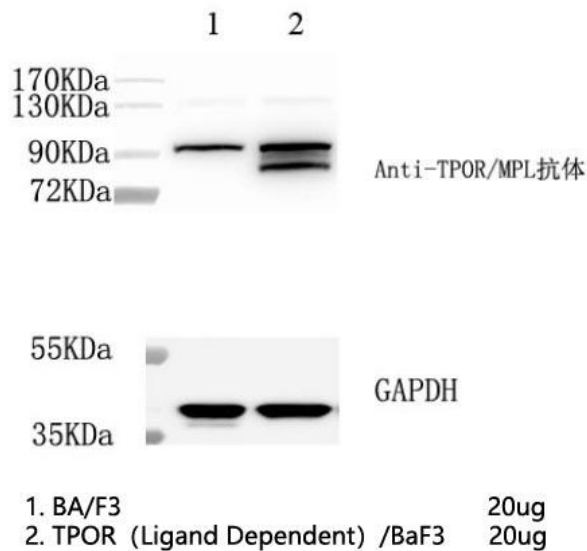


图 4: WB of TPOR(Ligand Dependent) /BaF3 Expression

8. 相关产品

N/A