

TPR-MET [D1228N]/BaF3

CBP73366

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

MET 是间质表皮转化因子，即 c-MET (cellular-mesenchymal to epithelial transition factor) 基因的缩写。c-MET 基因位于人类 7 号染色体长臂 (7q31)，基因大小约为 120 kb，包括 21 个外显子和 20 个内含子。c-MET 基因编码的 c-MET 蛋白，存在细胞表面，属于受体酪氨酸激酶 (RPTKs) 的一种。蛋白由 α 亚基和 β 亚基以二硫键形式连接。 α 亚基仅含有胞外区，而 β 亚基有胞外区、跨膜区和胞内区，前者借助二硫键附于后者形成异二聚体。c-MET 是的肝细胞生长因子 (HGF) 酪氨酸激酶受体，具有自主磷酸化活性，与多种癌基因产物和调节蛋白相关，参与细胞信号转导和细胞骨架的调控。MET 与 HGF 结合后，发生自身磷酸化并激活下游 PI3K/ALK、RAS-MAPK、 β -连环蛋白信号通路等多条信号通路，从而发挥其促细胞增殖、细胞生长、细胞迁移、侵袭血管及血管生成等效应，在组织正常发育和肿瘤进展中发挥关键作用。HGF/MET 通路异常与肿瘤的发生和转移相关并诱导耐药性的产生，包括 MET 基因重排、基因突变、基因扩增和蛋白过表达。Tpr-met 是第一号染色体上的 TPR (Translocated Promoter Region) 上游区域嵌入到第七号染色体上 Met kinase 区域所产生的一种致癌性融合突变，在这种重排中，编码 Met 细胞外、跨膜和近膜结构域的外显子丢失。它不需要依赖 HGF 的刺激下其 kinase 活性持续很高，并且本身的酪氨酸呈现被磷酸化状态，从而引起 MET 信号通路的异常激活和细胞增殖、运动及血管和其他肿瘤微环境状态的改变，最终成为肿瘤发生和进展的驱动因素。已经在多种上皮癌中观察到 MET 基因扩增、种系或体细胞突变或受体过表达的失调，包括乳腺癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、肾乳头状癌、肝细胞癌和胃癌。

2. 产品介绍

科佰生物推出 TPR-MET [D1228N]/BaF3 药靶细胞，其通过慢病毒转染的方法引入 D1228N 突变状态的 TPR-MET 基因到 BaF3 细胞系中，稳定表达人突变形态下的 TPR-MET [D1228N] 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。

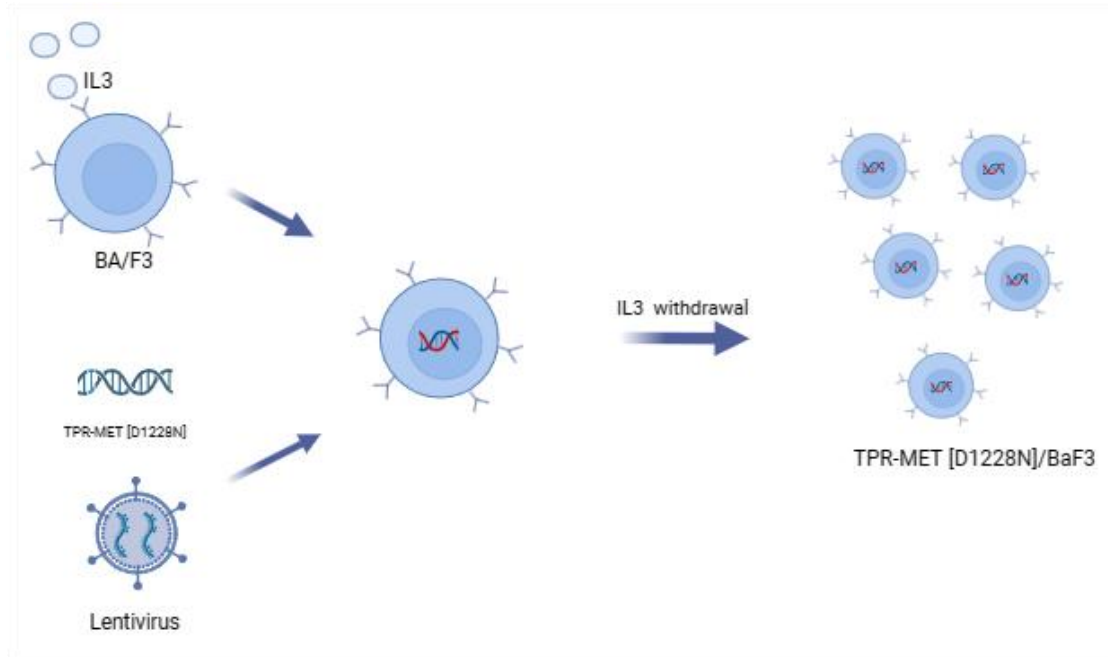


图 1: TPR-MET [D1228N]/BaF3 细胞构建流程

3. 细胞基本信息

母细胞: Ba/F3

表达基因: TPR-MET [D1228N]

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
TPR-MET [D1228N]/BaF3 完全培养基	Cobioer	CBP73366M
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 TPR-MET [D1228N]/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 TPR-MET [D1228N]/BaF3 细胞,Cat. # CBP73366 开展，本实验使 Crizotinib、Capmatinib、AMG-458 为测试样本，验证本模型的生物功能。

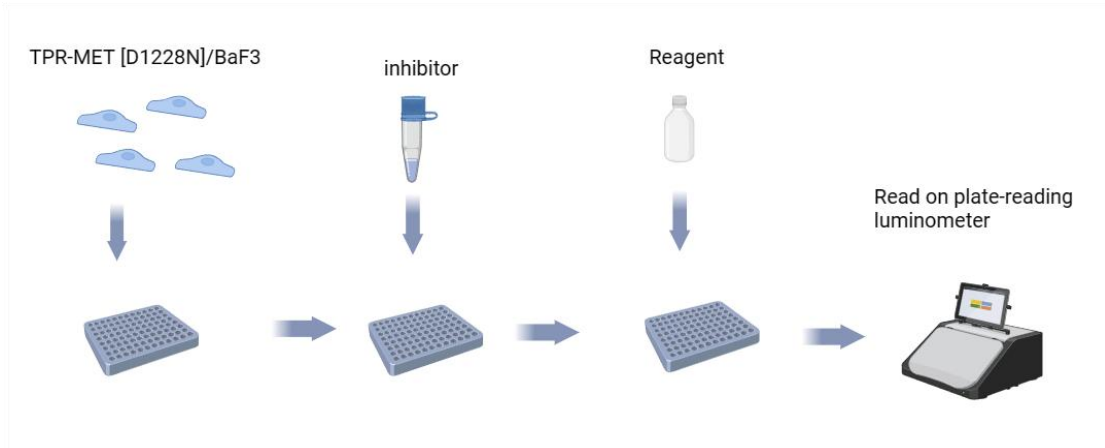


图 2: TPR-MET [D1228N]/BaF3 增殖抑制实验流程示意图

- 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 $5 \times 10^4 / \text{ml}$
- 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 TPR- Met D1228N Cells (C1)

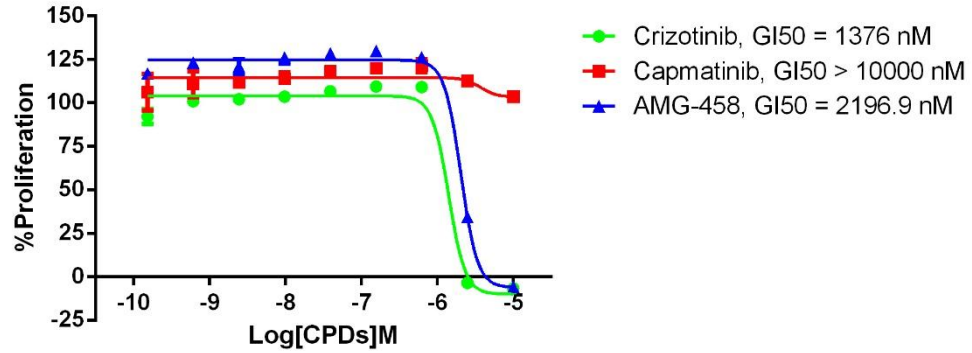


图 3: 使用 Crizotinib、Capmatinib、AMG-458 增殖抑制实验结果

7.2 WB 验证结果

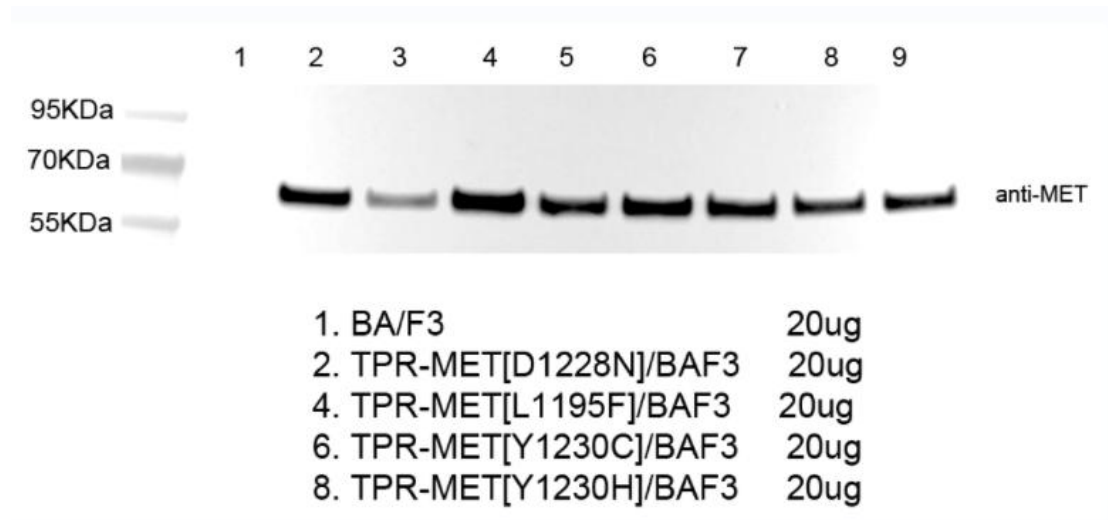


图 4: WB of TPR-MET [D1228N]/BaF3 Expression

7.3 Sanger 测序验证结果

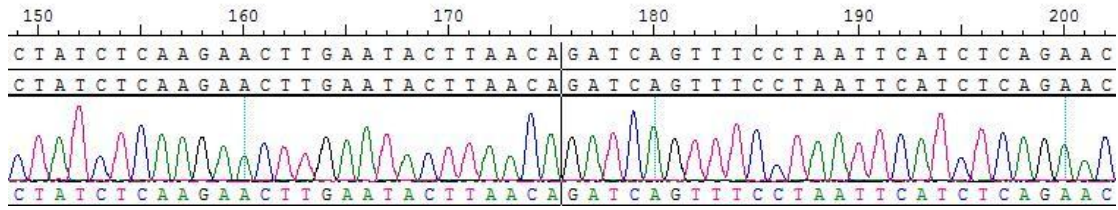


图 5：一代测序验证基因突变（TPR-MET [D1228N]/BaF3 Fusion）

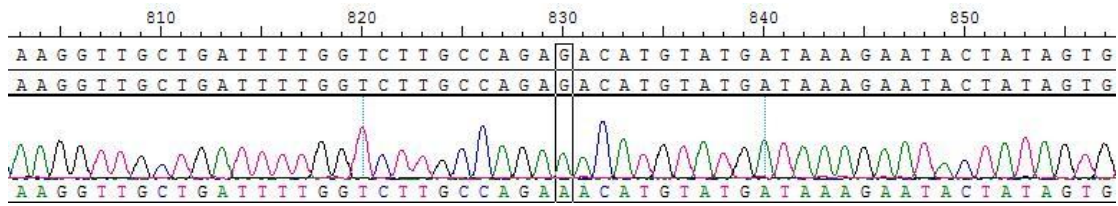


图 6：一代测序验证基因突变（TPR-MET [D1228N]/BaF3 D1228N）

8. 相关产品

名称	货号
TPR-MET/BaF3	CBP73365
TPR-MET [D1228N]/BaF3	CBP73366
TPR-MET [F1200I]/BaF3	CBP73367
TPR-MET [L1195F]/BaF3	CBP73368
TPR-MET [Y1230H]/BaF3	CBP73369
TPR-MET [Y1230C]/BaF3	CBP73370
TPR-MET [G1163R]/BaF3	CBP73371