c-Kit D816V/BaF3

CBP73206

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

c-Kit 是 4 号染色体长臂区域 (4q11-4q13) 中的一种原癌基因，编码一种 III 型穿膜受体酪氨酸激酶蛋白 (CD117)，由五个 IgG 样细胞外结构域、一个跨膜螺旋和一个自身抑制性近膜 (JM) 结构域和一个细胞质结构激酶域组成。CD117 结合干细胞因子 (SCF) 后就会形成一个二聚体，激活其内在的酪氨酸激酶活性，这会反过来磷酸化、激活传递信号的信号转导分子。c-Kit 基因在许多细胞类型的增殖、分化、迁移和凋亡中发挥作用，从而在造血、干细胞维持中发挥重要作用如黑色素生成以及肥大细胞的发育、迁移和功能。而 c-Kit 基因量异常(过表达或表达减少甚至缺失),表达产物异常(主要是 DNA 结构的改变,如基因缺失,突变等引起基因失转录或产生结构异常的基因产物)等与肿瘤的发生关系密切。c-Kit 过表达最常见的包括胃肠道肿瘤、结直肠癌、小细胞肺癌、神经母细胞瘤和恶性间皮瘤。因此，c-Kit 被认为是治疗多种类型癌症的关键靶点之一。迄今为止发现了许多 Kit 突变点，并且在不同的癌症类型中有所不同，反映了每个突变对下游信号通路的影响。比如胞内和胞外 juxtamembrane，位于外显子 8，9 以及外显子 17，其对应于在激酶结构域活化环，这些突变破坏了 c-Kit 的自抑制效应。c-kit 突变往往是在不需要配体 SCF 结合的前提下，直接导致 c-Kit 的二聚化和激活。

2. 产品介绍

科佰生物推出 c-Kit D816V/BaF3 药靶细胞，其通过慢病毒转染的方法引入 D816V 突变状态的 c-Kit 基因到 BaF3 细胞系中，稳定表达人突变形态下的 c-Kit 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。

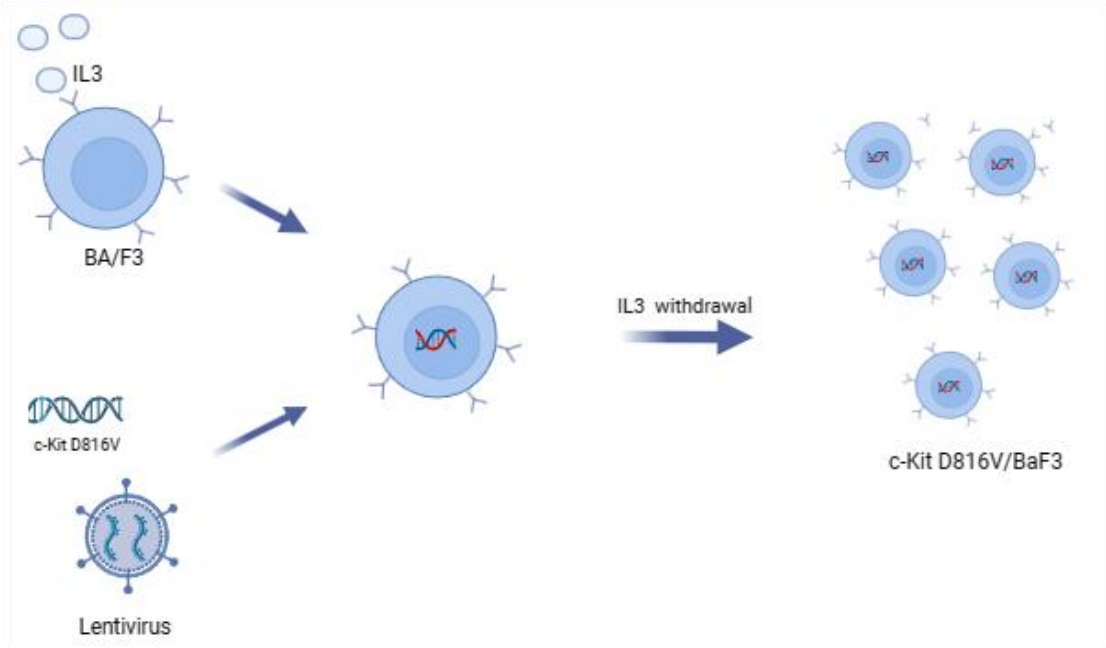

图 1: c-Kit D816V/BaF3 细胞构建流程

3. 细胞基本信息

母细胞: Ba/F3

表达基因: c-Kit D816V

传代培养基: RPMI-1640+10%FBS

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
c-Kit D816V/BaF3 完全培养基	Cobioer	CBP73206M
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 c-Kit D816V/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 c-Kit D816V /BaF3 细胞,Cat. # CBP73206 开展，本实验使用 AC710、Avapritinib、Sunitinib 为测试样本，验证本模型的生物功能。

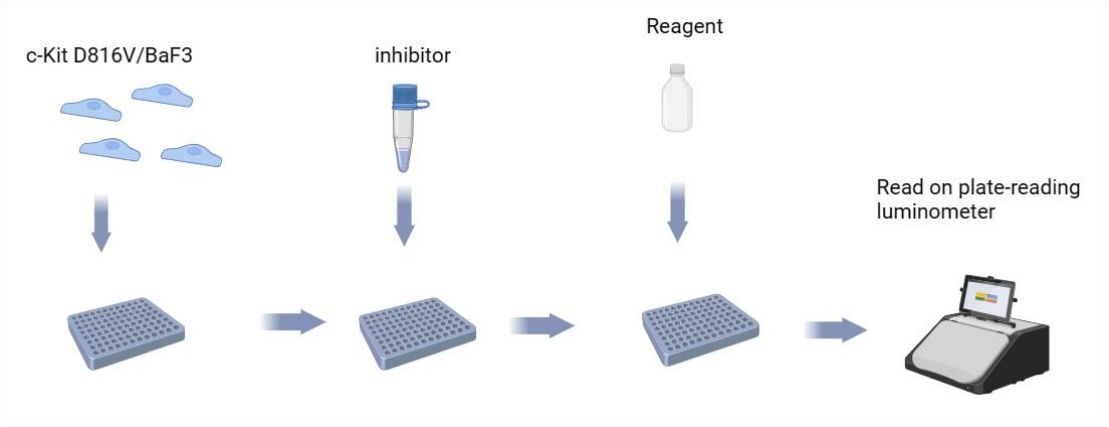

图 2: c-Kit D816V/BaF3 增殖抑制实验流程示意图

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

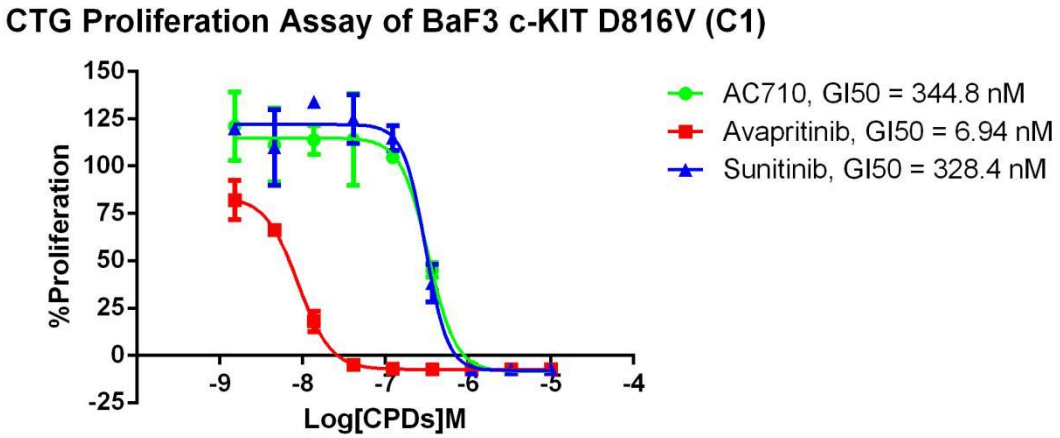

图 3：使用 AC710、Avapritinib、Sunitinib 增殖抑制实验结果

7.2 WB 验证结果

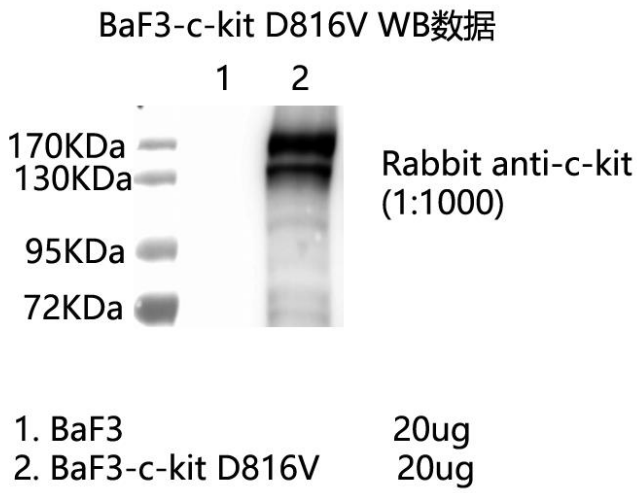

图 4： WB of c-Kit D816V/BaF3 Expression

7.3 Sanger 测序验证结果

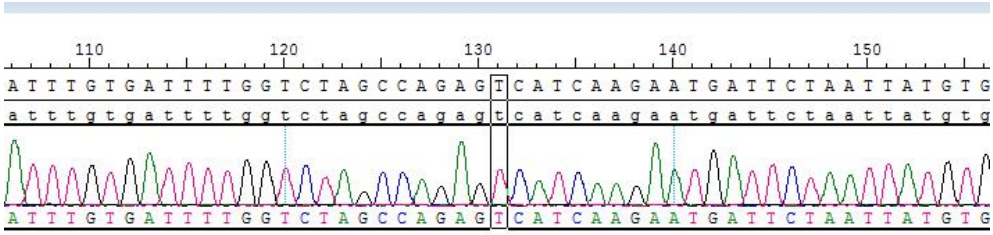

图 5：一代测序验证基因突变（c-Kit D816V/BaF3）

8. 相关产品

c-Kit D816H/BaF3	CBP73282
c-Kit D816V/BaF3	CBP73206
c-Kit D816Y/BaF3	CBP73276
c-Kit K642E/BaF3	CBP73332
c-Kit K642E-D816A/BaF3	CBP73294
c-Kit L576P/BaF3	CBP73298
c-Kit A502_Y503dup/BaF3	CBP73296
c-Kit W557G/BaF3	CBP73293
c-Kit W557_K558del/BaF3	CBP73233
c-Kit W557_K558del-D816V/BaF3	CBP73285
c-Kit W557_K558del-T670I/BaF3	CBP73284
c-Kit W557_K558del-V654A/BaF3	CBP73283
c-Kit V559A/BaF3	CBP73286
c-Kit V559D/BaF3	CBP73234
c-Kit V560D/BaF3	CBP73235
c-Kit V560Del/BaF3	CBP73314
c-Kit D820Y/BaF3	CBP73236
c-Kit N822K/BaF3	CBP73279
c-Kit Y823D/BaF3	CBP73208
c-Kit WT (SCF1 Dependent)/BaF3	CBP73269