

产品手册

H_EGFR WT BAF3 Cell Line

H_EGFR WT BAF3 细胞系

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：V2.12.2

目录

一、	产品基本信息及组分.....	3
二、	包装、运输及储存.....	3
三、	产品描述.....	4
四、	材料准备.....	5
1.	细胞培养、冻存、复苏试剂准备.....	5
2.	试剂耗材准备.....	5
五、	细胞复苏、传代、冻存.....	6
1.	细胞复苏.....	6
2.	细胞传代.....	6
3.	细胞冻存.....	6
六、	使用方法.....	7
1.	杀伤验证实验.....	7
1)	加样步骤.....	7
2)	报告基因检测.....	8
3)	验证结果.....	9
附录:	10
相关产品	11
使用许可协议:	11

一、 产品基本信息及组分

基本信息

产品编号	产品名称	规格
GM-C28267	H_EGFR WT BAF3 Cell Line	5E6 Cells/mL

组成成分

产品编号	产品名称	规格	数量	储存
GM-C28267	H_EGFR WT BAF3 Cell Line	5E6 Cells/mL	1 管	-196°C

二、 包装、运输及储存

1. 细胞系产品干冰运输，-196°C 以下（冰箱或液氮的气相）长期储存。
2. 接触产品请带手套。请收到产品立即确认产品是否为冻存状态，-196°C 以下（冰箱或液氮的气相）长期储存。
3. 本产品相关 Assay，应在二级生物安全实验室或生物安全柜中进行。

三、 产品描述

EGFR 是受体酪氨酸激酶家族 (TK) 的成员。广泛分布于哺乳动物成纤维细胞、上皮细胞等细胞表面, EGFR 信号通路对细胞的增殖、分化等生理过程发挥重要的作用。当 EGFR 发生突变时, 导致 EGFR 信号通路在没有配体结合的情况持续激活, 从而导致细胞异常增殖。EGFR 突变在多种肿瘤中被发现, 例如非小细胞肺癌、乳腺癌、结肠癌和头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)等。针对 EGFR 突变有多种酪氨酸激酶抑制剂(TKI), 例如阿法蒂尼(Afatinib)、厄洛替尼(Erlotinib)、吉非替尼(Gefitinib)、奥希替尼(Osimertinib、AZD 9291)和西妥昔单抗(cetuximab)等。BA/F3 细胞是一种 IL-3 依赖的的前体 B 细胞, 而一些蛋白激酶可以代替 IL-3 使 Ba/F3 细胞依赖性生长, 再使用抑制剂拮抗此作用, 因此可利用此作用进行激酶抑制剂的研究。

四、 材料准备

1. 细胞培养、冻存、复苏试剂准备

细胞复苏培养基:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+10 ng/mL EGF
细胞生长培养基:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+10 ng/mL EGF+0.25 µg/mL Puromycin
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S

2. 试剂耗材准备

试剂准备

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Recombinant Human EGF	100 µg	碧云天/P5552
Pen/Strep	100 mL	Thermo/15140-122
Fetal Bovine Serum	500 mL	ExCell/FSP500
RPMI 1640	500 mL	gibco/C11875500BT
96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture	96-well	Corning/3894
96 well round well culture plate	96-well	NEST/701001
96 well White Flat Bottom Polystyrene	96-well	Corning/3912
Not Treated Microplate		
CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	/	Promega/G7572
Osimertinib (AZD9291)	10 mM (1 mL in DMSO)	Selleck.cn/S7297
Erlotinib (OSI-774)	10 mM (1 mL in DMSO)	Selleck.cn/S7786
Afatinib (BIBW2992)	10 mM (1 mL in DMSO)	Selleck.cn/S1011
重组 Anti-EGFR 抗体[E235]	40 µL	Abcam/ab32077
Anti-H_EGFR hIgG1 Antibody (Necitumumab)	/	Genomeditech/GM-49155AB

Equipment	Manufacturer/Catalogue No.
细胞计数仪	ThermoFisher Scientific/Countess 3
酶标仪	Moleculardevices/SpectraMax L

五、细胞复苏、传代、冻存

1. 细胞复苏

- 37°C水浴锅预热复苏培养基，加入预热后的复苏培养基 5 mL 至 15 mL 离心管。
- 从液氮中取出冻存细胞并迅速放入 37°C恒温水浴锅，将细胞液面浸至水面以下不断摇动至融化（通常 2-3 分钟）。
- 用 70%乙醇擦拭冻存管外部以降低污染的几率。在生物安全柜或超净台中将冻存管中的细胞悬液转移到步骤 a) 的离心管中，轻轻混匀， $176 \times g$ ，离心 5 min，使细胞沉淀，弃上清。
- 使用 1 mL 复苏培养基重悬细胞沉淀，可取出部分使用台盼蓝染色计数活细胞，活细胞 $\geq 3 \times 10^6$ cells/mL。
- 调整活细胞密度到 $3-5 \times 10^5$ cells/mL，将细胞悬液接种至 1-2 个 T25 中（3-5 mL，培养面积 25 cm^2 ），竖瓶培养。

3. 细胞冻存

- 使用 $176 \times g$ ，3 min 离心收集细胞。
- 使用预冷细胞冻存液（90% FBS + 10% DMSO）重悬细胞，细胞密度调整为 5×10^6 cells/mL，每管 1 mL 分装到细胞冻存管中。
- 拧紧盖子，适当标记后，将冻存管置于梯度降温盒中， -80°C 下保存至少 1 天，尽快转移至液氮中。

2. 细胞传代

注：细胞复苏后的 1 至 2 代，使用复苏培养基，待细胞状态稳定后，再更换为含有抗生素的生长培养基。

- 细胞为小鼠原 B 细胞，悬浮生长。
- 首次复苏后，约 48-72 h 可进行第一次传代，此次传代后细胞培养基可调整为添加抗生素的生长培养基。若 48 h 未传代，建议适当补加复苏培养基，瓶体改为横向放置。
- 推荐细胞接种密度在 $3.5-4.5 \times 10^5$ cells/mL，当细胞浓度达到 $1-1.2 \times 10^6$ cells/mL 时进行传代，1 传 3-1 传 5，2-3 天传代，不要让其浓度超 1.4×10^6 cells/mL，推荐使用 T25 瓶进行传代培养，也可通过计数控制细胞传代密度。
- 该细胞为悬浮细胞，传代时推荐使用【半换液法】对细胞状态较为有利。传代时可以直接向培养瓶中添加生长培养基，然后将细胞吹打均匀后移入新的 T25 培养瓶中继续培养。

注意事项：

- 细胞倍增率稳定后再用于检测或冻存，一般在 7-10 天左右。常规的稳定倍增率是 24 ± 8 小时。
- 首次传代时注意营养，不处理时务必隔天适当补加复苏培养基。
- FBS 需 56°C 水浴 30 分钟，可热灭活补体和部分病毒，但不显著影响大多数生长因子和细胞因子活性。

六、使用方法

1. 杀伤验证实验

操作步骤可调整优化，对于本实验，推荐 H_EGFR WT BAF3 Cell Line 细胞量为 1×10^4 cells/孔。本次实验使用 Osimertinib、Erlotinib、Afinib 作为阳性药物，Conc.01 浓度为 15 μM ，4 倍梯度稀释，以 Osimertinib 药物为例，Conc.01-Conc.9 分别排布在 B2-B10，B11 为 0 浓度对照，周围孔加入 100 μL PBS，以防止边孔蒸发。

具体孔板排布如下：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
B	Osimertinib	PBS	15 μM	3.75 μM	937.5 μM	234.38 nM	58.59 nM	14.65 nM	3.66 nM	915.53 pM	228.88 pM	0	PBS
C	Erlotinib	PBS	15 μM	3.75 μM	937.5 μM	234.38 nM	58.59 nM	14.65 nM	3.66 nM	915.53 pM	228.88 pM	0	PBS
D	Afinib	PBS	15 μM	3.75 μM	937.5 μM	234.38 nM	58.59 nM	14.65 nM	3.66 nM	915.53 pM	228.88 pM	0	PBS
E		PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
F													
G													
H													

1) 加样步骤

- 在实验前 1-2 h，将细胞从培养瓶中取出，使用 Assay Buffer 清洗 2 遍，检测细胞活力并计数，再以 Assay Buffer 调整细胞浓度为 2×10^5 cells/mL。以排枪加 50 μL 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 100 μL PBS。盖板上盖，于孵箱中孵育待用。
- 使用 1 个无菌 96 孔 V 底板准备药物稀释。
- 每个待测药物，使用一行（如 B2-B10）。
- 母液配置

药物名称	储液	母液	配置方法
Osimertinib	10 mM	1 mM	取 2 μL 储液+18 μL Assay Buffer
Erlotinib	10 mM	1 mM	取 2 μL 储液+18 μL Assay Buffer
Afinib	10 mM	1 mM	取 2 μL 储液+18 μL Assay Buffer

- 96 孔 V 底板中，加入 Assay Buffer，各孔体积见下表，如 B2 孔加入 142.27 μL Assay Buffer，B3-B11 孔，加入 110 μL Assay Buffer。

- f) 吸取不同体积的待测样品母液，加入到第一个梯度稀释孔中（如 B2 中加入 4.4 μL Osimertinib），混匀。

	母液吸取	梯度稀释孔，依次从前孔吸取 36.67 μL ，加入次孔										对照孔	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11
A													
B	4.4 μL Osimertinib	加入	142.27 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	
C	4.4 μL Erlotinib	加入	142.27 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	
D	4.4 μL Afatinib	加入	142.27 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	110 μL	
E													
F													
G													
H													

- g) 以 Osimertinib 为例，从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 36.67 μL ，加入到第二个梯度稀释孔 B3，充分混匀。
- h) 以此类推，直至第 9 个梯度稀释孔（B10、C10、D10）。
- i) 将步骤 a 孵育的孔板取出。
- j) 加入步骤 h 准备好的梯度稀释液，每孔 50 μL 。
- k) 盖上板盖，于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中培养 72 h。
- l) 使用 CellTiter-Glo 报告基因检测试剂盒，检测读值。

2) 报告基因检测

参考报告基因检测说明书。

药物	0 μM	15 μM	228.88 μM
H_EGFR WT BAF3 Cell Line+ Osimertinib	236833	122	239809
H_EGFR WT BAF3 Cell Line + Erlotinib	222403	25285	216698
H_EGFR WT BAF3 Cell Line + Afatinib	216391	817	216918

3) 验证结果

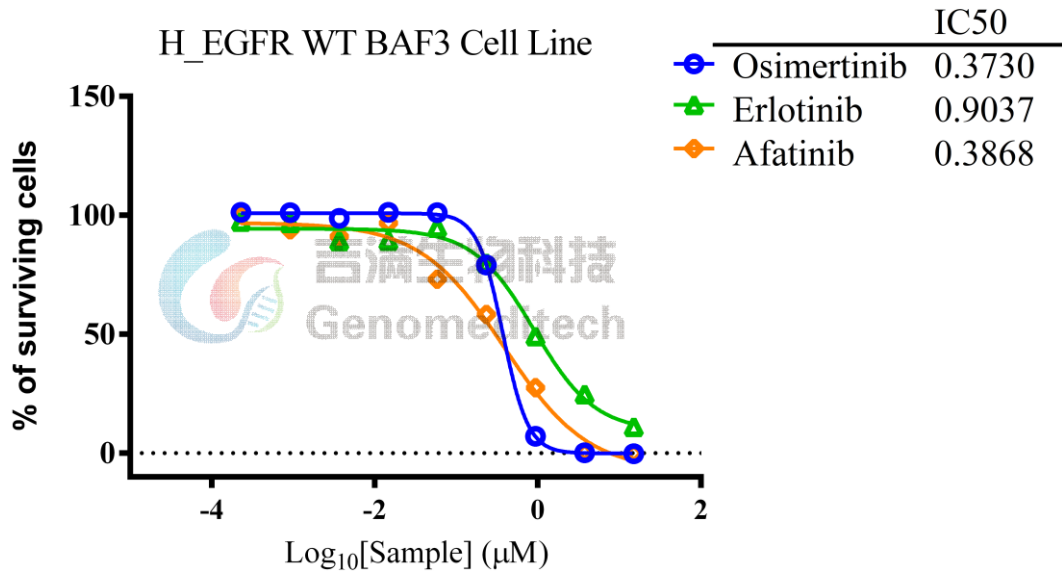


Fig 1. H_EGFR WT BAF3 Cell Line 使用 Osimertinib、Erlotinib、Afatinib 杀伤验证结果。换算方法：活细胞百分比=（加药孔-assay buffer 孔）/（不加药孔-assay buffer 孔）

附录:

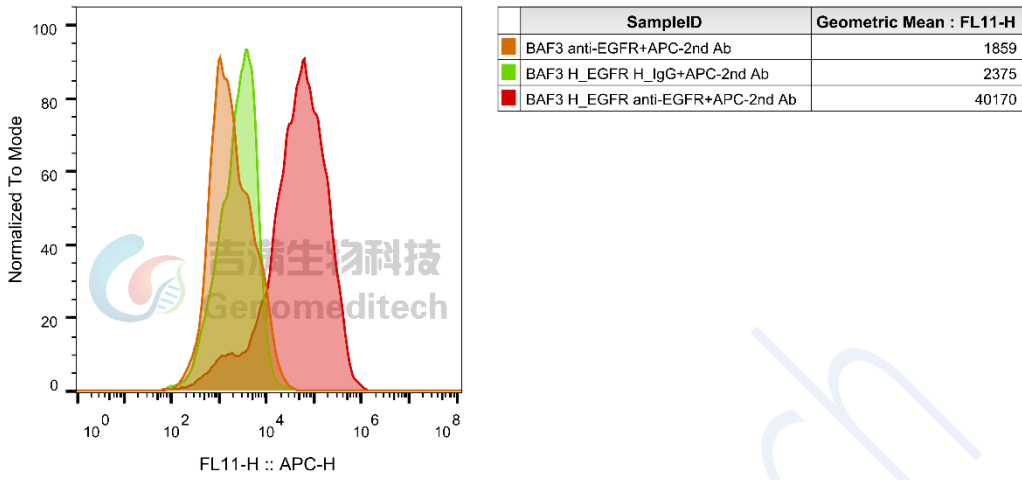


Fig 2. H_EGFR WT BAF3 Cell Line 使用 Anti-H_EGFR hIgG1 Antibody(Necitumumab) (Genomeditech/GM-49155AB) 流式验证结果

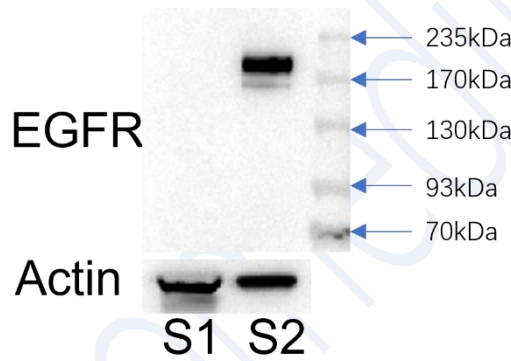


Fig 3. H_EGFR WT BAF3 Cell Line 使用重组 Anti-EGFR 抗体[E235] (Abcam/ab32077) WB 验证结果。S1: BAF3; S2: H_EGFR WT BAF3

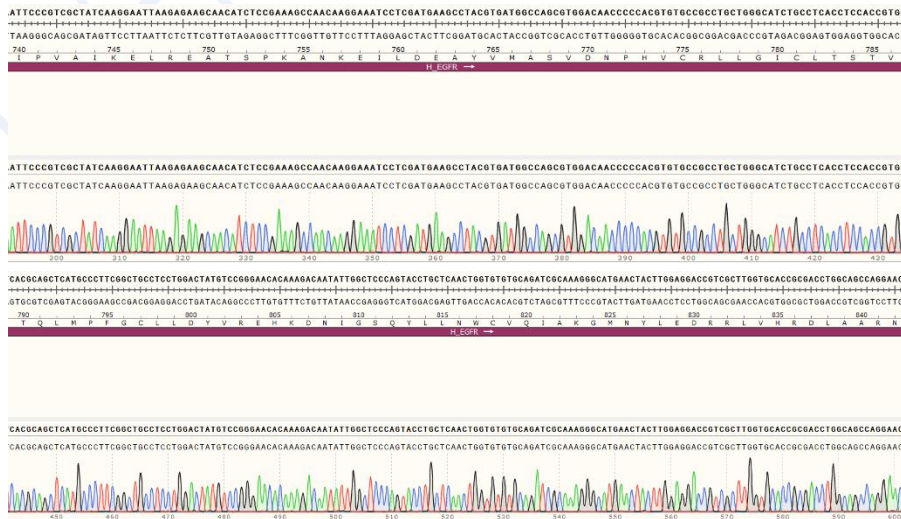


Fig 4. H_EGFR WT BAF3 Cell Line Sanger 测序结果

相关产品

EGF:EGFR BAF3	
H_EGFR(A763-Y764-ins-FQEA-C797S) BAF3 Cell Line	H_EGFR(A763-Y764insFQEA-T790M) BAF3 Cell Line
H_EGFR(D770_N771insSVD-T790M) BAF3 Cell Line	H_EGFR(D770-N771insGF) BAF3 Cell Line
H_EGFR(D770-N771insGT) BAF3 Cell Line	H_EGFR(D770-N771-ins-SVD-C797S) BAF3 Cell Line
H_EGFR(Del19-C797S) BAF3 Cell Line	H_EGFR(Del19-T790M-C797S) BAF3 Cell Line
H_EGFR(Del19-T790M-L718Q) BAF3 Cell Line	H_EGFR(Del19-T790M-L718V) BAF3 Cell Line
H_EGFR(H773_V774insNPH-T790M) BAF3 Cell Line	H_EGFR(H773-V774insAH) BAF3 Cell Line
H_EGFR(H773-V774-ins-NPH-C797S) BAF3 Cell Line	H_EGFR(L747S-C797S) BAF3 Cell Line
H_EGFR(L747S-T790M-C797S) BAF3 Cell Line	H_EGFR(L747V-C797S) BAF3 Cell Line
H_EGFR(L858R-C797S) BAF3 Cell Line	H_EGFR(L858R-L718V) BAF3 Cell Line
H_EGFR(L858R-T790M) BAF3 Cell Line	H_EGFR(L858R-T790M-L718Q) BAF3 Cell Line
H_EGFR(L858R-T790M-L718V) BAF3 Cell Line	H_EGFR(L861Q-T790M-C797S) BAF3 Cell Line
H_EGFR(N771-P772insN) BAF3 Cell Line	H_EGFR(P772-H773insNPY764-V765insHH) BAF3 Cell Line
H_EGFR(R776G-C797S) BAF3 Cell Line	H_EGFR(T790M-C797S) BAF3 Cell Line
H_EGFR(T790M-L861Q) BAF3 Cell Line	H_EGFR(V769-D770insASV-T790M) BAF3 Cell Line

使用许可协议:

凡购买及使用本细胞系产品，即表明使用者自愿接受并遵守以下相关使用政策：

- 本细胞系产品限于科研用途，不得被利用于任何商业用途。
- 本产品严禁用于人类或动物疾病诊治，也不得直接用于人体相关实验。
- 用户及为其利益服务的第三方承包商仅可在约定科研范围内使用本材料及其子代，不得进行修饰，亦不得向任何其他实体（包括关联机构）分发、销售、转让或以其他方式提供吉满生物材料。
- 如需将本产品用于本声明范围以外的用途，须事先获得吉满生物科技（上海）有限公司的书面许可，详情请联系吉满生物科技（上海）有限公司。