

产品手册

H_EGFR(D770-N771-ins-SVD-C797S) BAF3 Cell Line

H_EGFR(D770-N771-ins-SVD-C797S)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：V2.9.240522

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) | 验证结果..... | 9 |
| 附录 1: | Western Blot 验证结果..... | 10 |
| 附录 2: | Sanger 测序结果..... | 10 |
| 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-C30931 | H_EGFR(D770-N771-ins-SVD-C797S) 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-C30931 | H_EGFR(D770-N771-ins-SVD-C797S) 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. 本产品相关实验，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 |
| 细胞生长培养基: | RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+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 |
| Fetal Bovine Serum | 500 mL | Cegrogen biotech/A0500-3010 |
| RPMI 1640 | 500 mL | Viva Cell BIOSCIENCES/C3010-0500 |
| 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 | | |
| GMTiter™ Luminescent Cell Viability Assay | / | Genomeditech/GM-040504 |
| 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 |
| EGFR-IN-7(TQB3804) | 10 mg | BioChem Partner/BCP34208 |
| EGF Receptor (C74B9) Rabbit mAb | 100 µL | Cell Signaling/#2646 |

重要仪器

| 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 3min，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 cm²），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。

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(D770-N771-ins-SVD-C797S) BAF3 Cell Line 细胞量为 1×10^4 cells/孔。本次实验使用 Erlotinib、Afatinib、TQB3804、Osimertinib 作为阳性药物，Conc.01 终浓度为 $10 \mu\text{M}$ ，3 倍梯度稀释，以 Erlotinib 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 $100 \mu\text{L}$ 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 | Erlotinib | PBS | 10 μM | 3.33 μM | 1.11 μM | 370.37 nM | 123.46 nM | 41.15 nM | 13.72 nM | 4.57 nM | 1.52 nM | 0 | PBS |
| C | Afatinib | PBS | 10 μM | 3.33 μM | 1.11 μM | 370.37 nM | 123.46 nM | 41.15 nM | 13.72 nM | 4.57 nM | 1.52 nM | 0 | PBS |
| D | TQB3804 | PBS | 10 μM | 3.33 μM | 1.11 μM | 370.37 nM | 123.46 nM | 41.15 nM | 13.72 nM | 4.57 nM | 1.52 nM | 0 | PBS |
| E | Osimertinib | PBS | 10 μM | 3.33 μM | 1.11 μM | 370.37 nM | 123.46 nM | 41.15 nM | 13.72 nM | 4.57 nM | 1.52 nM | 0 | PBS |
| F | | PBS | PBS | PBS | PBS | PBS | PBS | PBS | PBS | PBS | PBS | PBS | |
| G | | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | | |

1) 加样步骤

- 实验前 1-2h，将细胞从培养瓶中取出，离心收集细胞，使用 Assay Buffer 清洗后重悬细胞，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 $50 \mu\text{L}$ 细胞/孔至中间孔。周围的孔加 $100 \mu\text{L}$ PBS。盖上市盖，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）。

d) 母液配置

| 药物名称 | 储液 | 母液 | 配置方法 |
|-------------|-------|------|--|
| Erlotinib | 10 mM | 1 mM | 取 2 μ L 储液+18 μ L Assay Buffer |
| Afatinib | 10 mM | 1 mM | 取 2 μ L 储液+18 μ L Assay Buffer |
| TQB3804 | 10 mM | 1 mM | 取 2 μ L 储液+18 μ L Assay Buffer |
| Osimertinib | 10 mM | 1 mM | 取 2 μ L 储液+18 μ L Assay Buffer |

e) 96 孔 V 底板中, 加入 Assay Buffer, 各孔体积见下表, 如 B2 孔加入 80.9 μ L Assay Buffer, B3-B11 孔, 加入 55 μ L 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 1.65 μ L Erlotinib), 混匀。

| | 母液吸取 | 梯度稀释孔, 依次从前孔吸取 27.5 μ L, 加入次孔 | | | | | | | | | | | | | |
|---|--------------------------|-----------------------------------|--------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|----|--|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | 11 | 12 | |
| A | | | | | | | | | | | | | | | |
| B | 1.65 μ L Erlotinib | 加入 | 80.9 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | | |
| C | 1.65 μ L Afatinib | 加入 | 80.9 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | | |
| D | 1.65 μ L TQB3804 | 加入 | 80.9 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | | |
| E | 1.65 μ L Osimertinib | 加入 | 80.9 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | 55 μ L | | |
| F | | | | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | | | | |

g) 以 Erlotinib 为例, 从第一个梯度稀释孔 B2 中吸取 27.5 μ L, 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。

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 μ L。

k) 盖上班盖, 于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱中培养 72 h。

l) 使用 GMTiter™ 细胞活力检测试剂盒检测。

2) 验证结果

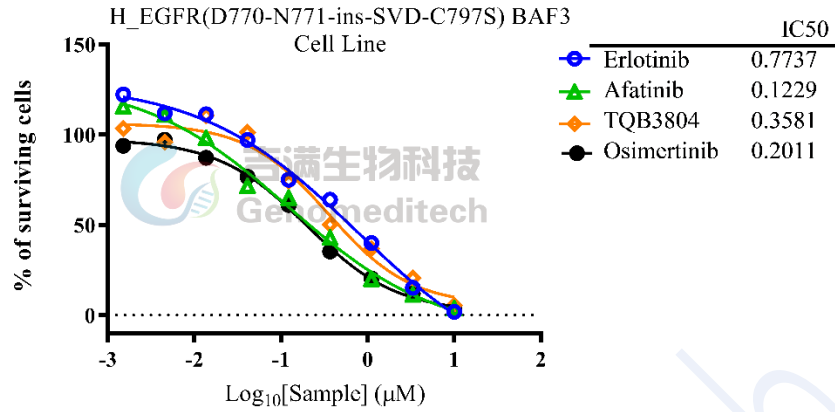


Fig 1. H_EGFR(D770-N771-ins-SVD-C797S) BAF3 Cell Line 使用 Erlotinib、Afatinib、TQB3804、Osimertinib 杀伤验证结果。换算方法：活细胞百分比=（加药孔-assay buffer 孔）/（不加药孔-assay buffer 孔）

附录 1: Western Blot 验证结果

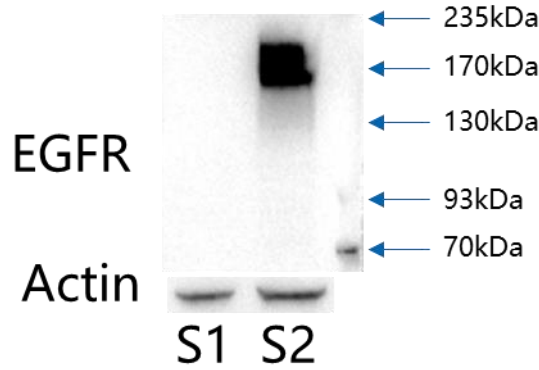


Fig 2. H_EGFR(D770-N771-ins-SVD-C797S) BAF3 Cell Line 使用重组 EGF Receptor (C74B9) Rabbit mAb (Cell Signaling/#2646) 抗体 WB 验证结果。

S1: BAF3; S2: H_EGFR(D770-N771-ins-SVD-C797S) BAF3 Cell Line

附录 2: Sanger 测序结果

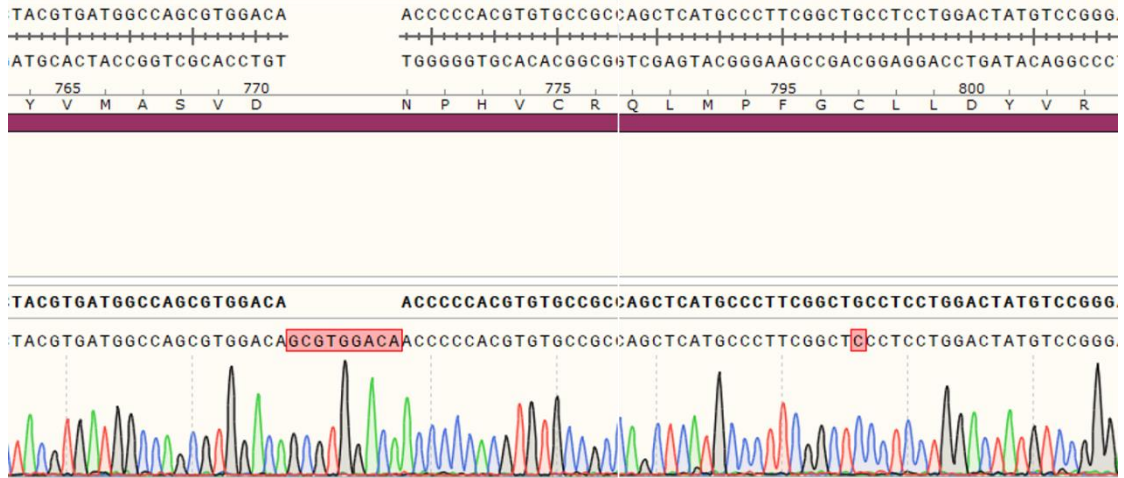


Fig 3 H_EGFR(D770-N771-ins-SVD-C797S) BAF3 Cell Line 测序结果

使用许可协议:

吉满生物将其许可材料的所有知识产权，独占的、不可转让的和不可发放分许可的权利授予给被许可人；吉满生物将保留许可材料、细胞系历史包、子代、包括修改材料中许可材料的所有权。

在吉满生物和被许可方之间，被许可方不允许以任何方式修改细胞系。被许可方不得分享、分发、出售、再授权或以其他方式将被许可材料、子代提供给其它实验室、部门、研究机构、医院、大学或生物技术公司等第三方非基于外包被许可人的研究目的而使用。

详情请参考吉满细胞系授权协议。

Genomeditech