

技术说明书

1. 细胞系信息

细胞系编号	MO0221
代次	P2
细胞系名称	Ba/F3 EGFR- K716A C797S L858R
基因 ID	NM_005228.3
宿主细胞系	小鼠 BaF3 细胞系
细胞类型	原 B 细胞
描述	Ba/F3 克隆，稳定表达携带 K716A C797S L858R 突变的外源性人 EGFR 基因。
数量	5×10 ⁶ /冻存管
稳定性	稳定培养至少 10 代
应用	药物筛选，动物药效学活性测试
冻存液	80% RPMI-1640+ 10%FBS + 10% DMSO
培养基	RPMI 1640+10% FBS+1% Pen/Strep
形态	多为单个、圆形悬浮细胞
传代培养	每 3 天以 1: 10 传代培养
培养条件	37°C, 5% CO ₂
存储	用 80%培养基, 10%FBS 和 10%DMSO 在液氮中冷冻
倍增时间	约 20 小时
支原体状态	阴性
生物安全等级	1
储存	接收后立即放入液氮

2. 背景

EGFR,表皮生长因子受体,是一种细胞表面受体酪氨酸激酶,并通过结合其特异性配体激活,如表皮生长因子(EGF)和转化生长因子 α (TGF- α),过表达或过度活跃与许多癌症有关,包括肺癌和结肠癌。

EGFR 作为驱动基因的鉴定导致了抗癌治疗剂的发展。包括吉非替尼.埃洛替尼.阿法替尼.奥希替尼(AZD9291)和西妥昔单抗。

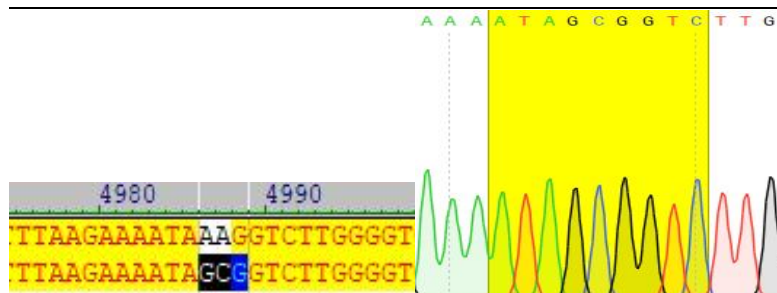
Ba/F3 细胞是小鼠 IL-3 依赖的原 B 细胞系,是研究激酶及其抑制剂的一个流行系统,这是因为一些蛋白激酶可以使 Ba/F3 细胞依赖于激酶的活化而不是 IL-3 的补充,而它们的抑制剂可以拮抗激酶依赖性生长。

3. 细胞系构建方法

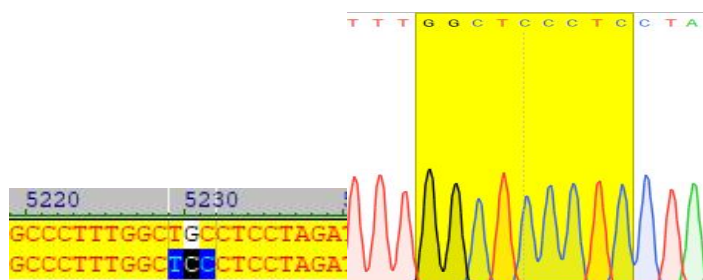
Ba/F3 EGFR- K716A C797S L858R 细胞系是使用表达人 EGFR 突变序列的逆转录病毒载体生成的。

4. PCR 产物测序鉴定

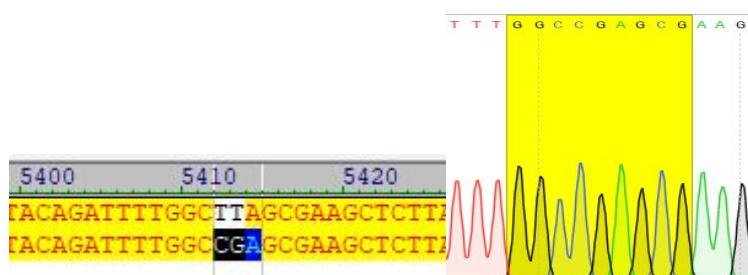
K716A



C797S



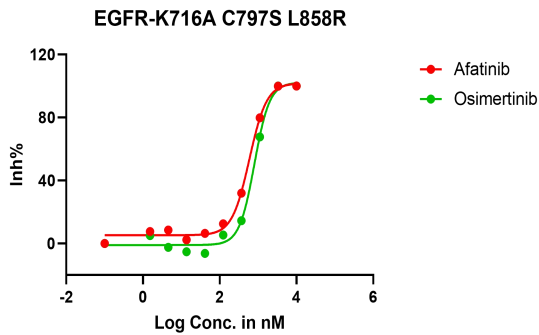
L858R



5. 应用

- a. 基于细胞的激酶抑制筛选
- b. 细胞活力测定
- c. 体内药效研究

compound	Abs.IC50(nM)	Rel.IC50(nM)
Osimertinib	29.01	805.10
Afatinib	27.41	594.70



六、细胞复苏

1. 预热培养基 (RPM1-1640 补充 10%FBS) 在 37°C 水浴中。
2. 将冷冻小瓶在 37°C 水浴中解冻 1-2 分钟。
3. 将小瓶转移到生物安全柜中, 并用 70%乙醇擦拭表面。
4. 拧开小瓶顶部, 将细胞悬液轻轻转移到含有的无菌离心管中 9.0mL 完全培养基。
5. 室温下旋转~125xg 5~7 分钟, 弃去上清液而不干扰。
6. 用适当体积的完全培养基重悬细胞沉淀, 并将细胞悬液转移到 T25 培养瓶。
7. 将烧瓶在 37°C 孵育。5%二氧化碳, 培养箱
8. 每 3 天 1: 3~1: 5 分饱和培养;在大约 $1\sim 3 \times 10^5$ 细胞中播种。

七. 细胞冻存

1. 使用前立即准备好新鲜的冷冻培养基 (80% RPMI-1640+ 10%FBS + 10% DMSO)。
2. 将冷冻培养基放在冰上并标记冷冻管。
3. 将细胞转移到无菌的锥形离心管中, 并计数细胞
4. 将细胞在室温下离心 250xg 5 分钟, 小心地吸出培养基.
5. 在冷冻的冷冻培养基中重悬至少 3×10^6 细胞密度.
6. 将 1ml 细胞悬液等分到每个细胞中。
7. 在 -80°C 冰箱中冷冻库塞尔冷冻容器过夜
8. 将小瓶转移到液氮中长期储存。