

---

## 技术说明书

### 1. 细胞系信息

细胞编号	MO0127
代次	P8
细胞系名称	NCI-H1975-mNeonGreen-Kras-G12A
宿主细胞系	人 NCI-H1975 细胞系
细胞类型	肺腺癌细胞
描述	稳定诱导表达携带 G12V 突变的 Kras 基因。
数量	5×10 <sup>6</sup> /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+2 μg/mL puro+10% DMSO
培养基	RPMI 1640+10% FBS+2 μg/mL puro+1% Pen/Strep
形态	贴壁细胞
传代培养	每 3 天以 1: 3 传代培养
培养条件	37°C, 5% CO <sub>2</sub>
存储	用 80%培养基, 10%FBS, 2 μg/mL puro 和 10%DMSO 在液氮中冷冻
倍增时间	约 50 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

Kras 是细胞基因组中第一个被鉴定的癌基因, Kras 蛋白能够结合 GDP/GTP 并具有内在的 GTPase 活性, 在细胞增殖的调节中起着重要作用, 突变引起的过度激活可导致细胞持续增殖, 最终发展为癌症。

### 3. 细胞系构建方法

NCI-H1975-EGFP-Kras G12V 细胞系是使用表达人 Kras-G12V 序列的逆转录病毒载体产生的 NCI-H1975 细胞系。

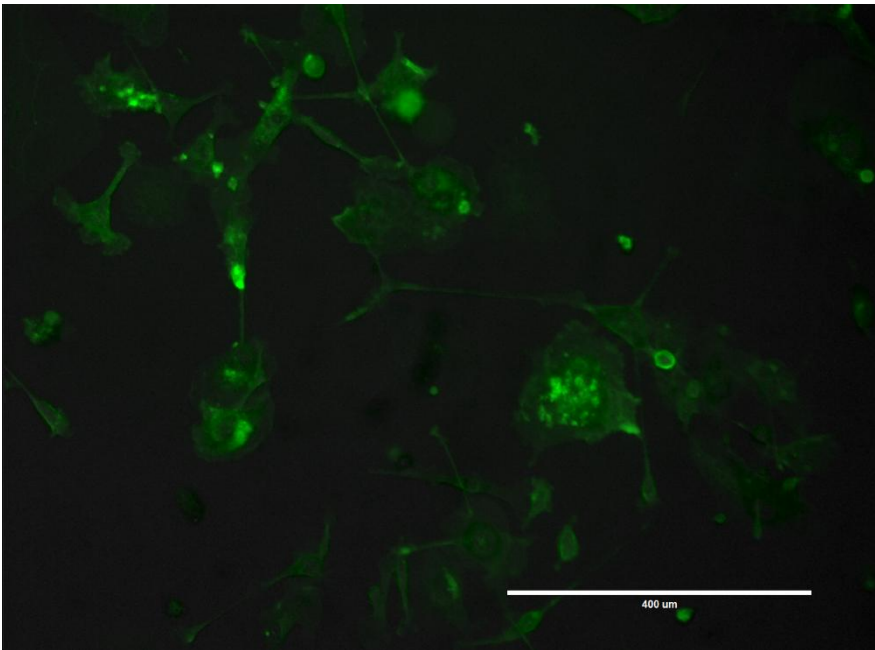
#### 4. PCR 产物测序鉴定

mNeonGreen-Kras-G12A

#### 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

使用荧光显微镜观察挑选的单克隆：



- a. 细胞增殖后，用通过敏感性测试的最低杀死 NCI-H1975 细胞的嘌呤霉素的浓度筛选感染后的 NCI-H1975 细胞，将细胞铺于 24 孔板， $2 \times 10^5$  cells /孔，加入 puro，筛出后扩大培养；
- b. 扩大培养后，将细胞密度稀释至 50 cells /5 mL，接于 96 孔板，四周加入 PBS 防止边缘效应；
- c. 持续观察细胞生长状态并补液，增殖后扩至 24 孔板，加入 5 μg/ml Doxycycline 48hr 时观察荧光表达，表达荧光的单克隆，扩大培养并冻存。