

---

## 技术说明书

### 1. 细胞系信息

|        |   |
|--------|---|
| 细胞编号   | MO0103  |
| 代次     | P8  |
| 细胞系名称  | NCI-H1975-mNeonGreen-Kras                       |
| 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- mNeonGreen-Kras 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。

---

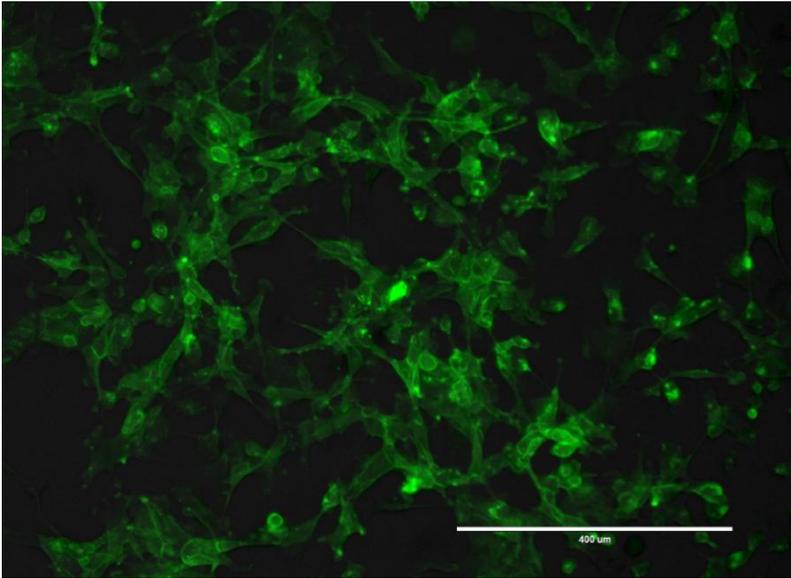
#### 4. PCR 产物测序鉴定

mNeonGreen-Kras

#### 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  $\mu$ g/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。