
技术说明书

1. 细胞系信息

| | |
|--------|---|
| 细胞编号 | MO0104 |
| 代次 | P8/9 |
| 细胞系名称 | NCI-H1975-EGFP-Kras G12D |
| 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 G12D 突变的 Kras 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+2 μg/mL puro+10% DMSO |
| 培养基 | RPMI 1640+10% FBS+2 μg/mL puro+1% Pen/Strep |
| 诱导表达条件 | 5 μg/mL Doxycycline 诱导 72hr |
| 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 ₂ |
| 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

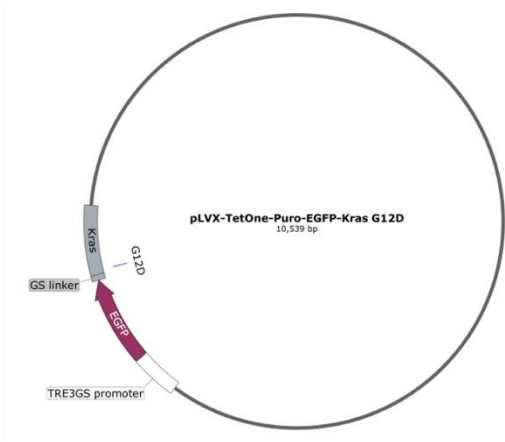
Kras 是细胞基因组中第一个被鉴定的癌基因, Kras 蛋白能够结合 GDP/GTP 并具有内在的 GTPase 活性, 在细胞增殖的调节中起着重要作用, 突变引起的过度激活可导致细胞持续增殖, 最终发展为癌症。Kras-G12D 为常见的 Kras 激活突变之一。

3. 细胞系构建方法

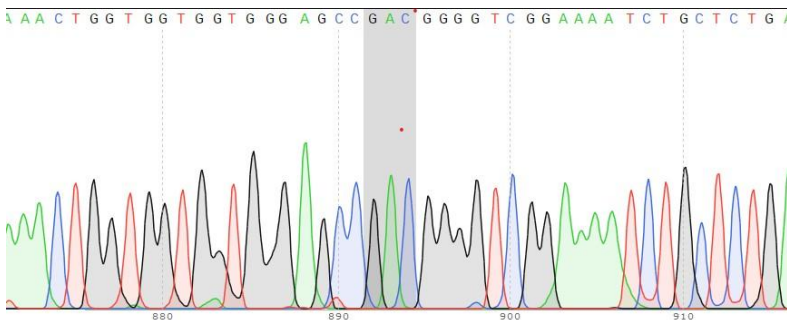
NCI-H1975-EGFP-Kras G12D 细胞系是使用表达人 Kras-G12D 序列的逆转录病毒感染 NCI-H1975 细胞后, 经 puromycin 筛选后获得的单克隆细胞。其携带的 Kras-G12D 受 Tet-On 调控, 经 5 μg/mL Doxycycline 诱导可以表达 EGFP-KrasG12D 融合蛋白。

4. PCR 产物测序鉴定

Kras-G12D 质粒图谱:



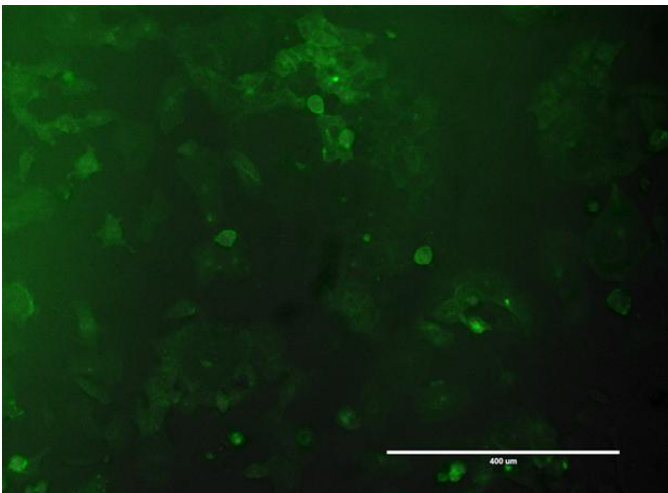
测序验证:



5. 应用

- 基于细胞的激酶抑制筛选
- 细胞活力测定
- 体内药效研究

6. 使用荧光显微镜观察挑选的单克隆:



- 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， 2×10^5 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Doxycycline 48hr 时观察荧光表达，表达荧光的单克隆，扩大培养并冻存。