

## 技术说明书

### 1. 细胞系信息

|        |   |
|--------|---|
| 细胞系编号  | MO0136  |
| 代次     | P2  |
| 细胞系名称  | Ba/F3 EGFR- D770_N771insGF                      |
| 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 D770_N771insGF 突变的外源性人 EGFR 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 + 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 <sub>2</sub>                        |
| 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 $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), 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 细胞是小鼠白细胞介素-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 补充, 而它们的抑制剂可以拮抗激酶依赖性生长。

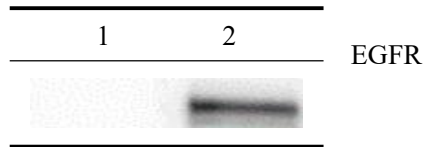
### 3. 细胞系构建方法

Ba/F3 EGFR- D770\_N771insGF 细胞系是使用表达人 EGFR 序列的逆转录病毒载体生成的。

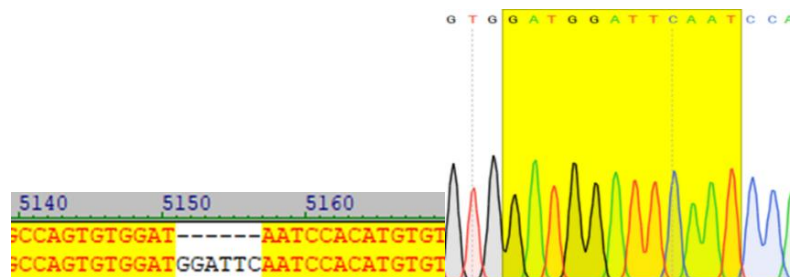
#### 4. 蛋白免疫印迹(Western Blot)与 PCR 产物测序鉴定

蛋白免疫印迹(Western Blot)

1. Ba/F3
2. Ba/F3 EGFR- D770\_N771insGF

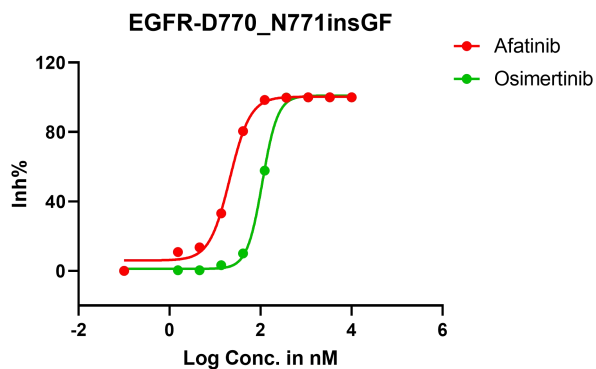


PCR 产物测序: D770\_N771insGF



#### 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 | 107.82       | 109.60       |
| Afatinib    | 19.72        | 21.16        |

#### 6. 细胞复苏

1. 在 37°C 水浴锅中预热培养基 (RPMI-1640+10%FBS+1% P/S);
2. 将冷冻管在 37°C 水浴锅中融化;
3. 将冷冻管转移到生物安全柜中, 并用 75%乙醇擦拭表面;
4. 将细胞悬液转移到含有的 9.0 mL 完全培养基的 15 ml 离心管中;
5. 室温下 1000 rpm 离心 5 min, 弃去上清液;
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. 将培养瓶置于 37°C 孵育, 5 % CO<sub>2</sub> 培养箱中培养;
8. 每 3 天以 1: 10 传代培养;

## 7. 细胞冻存

1. 细胞冻存前准备好新鲜的冷冻培养基 (80% RPMI-1640+ 10%FBS + 10% DMSO);
2. 将冷冻培养基放入冰箱预冷;
3. 将培养瓶中细胞转移到离心管中, 并计数细胞量;
4. 将细胞在室温下离心 1000 rpm 5 min, 弃去上清液.;
5. 使用冷冻培养基重悬至  $1 \times 10^6$ /ml 细胞;
6. 将细胞悬液转移到冻存管中, 放入程序降温盒;
7. 在  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中过夜, 转移到液氮中长期储存。