

技术说明书

1. 细胞系信息

细胞系编号	MO0133
代次	P2
细胞系名称	Ba/F3 EGFR- R999A
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 R999A 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

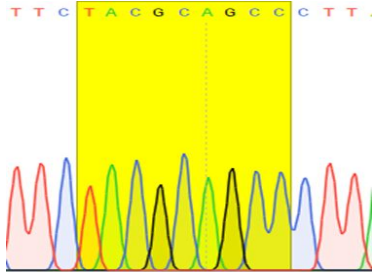
3. 细胞系构建方法

Ba/F3 EGFR- R999A 细胞系是使用表达人 EGFR 序列的逆转录病毒载体生成的。

4. PCR 产物测序鉴定

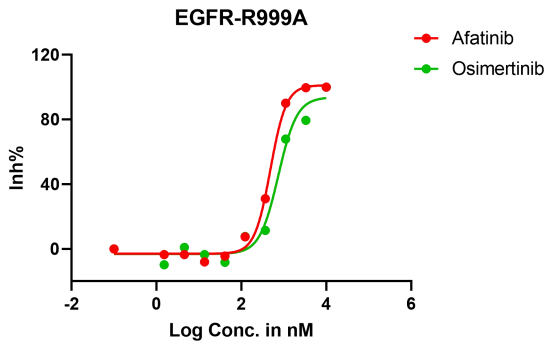
R999A

5820	5830	5840
GACTCCA	ACTTCTAC	AGAGCCCTTATGGAC
GACTCCA	ACTTCTAC	GCAAGCCCTTATGGAC



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	822.85	746.30
Afatinib	493.54	486.30

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 % CO₂ 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 1×10⁶/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°C 冰箱中过夜, 转移到液氮中长期储存。