

一、产品信息及背景

产品信息

产品编号	产品名称	规格	数量
GM-C31371	H_KIF5B-RET(G810S) BaF3 Cell Line	5E6 Cells/mL	1 管

背景:

KIF5B-RET 融合蛋白是由 KIF5B (kinesin family member 5B) 和 RET (Rearranged during Transfection) 基因的融合所产生的蛋白质。这种融合蛋白在一些肿瘤中发现,特别是肺癌和甲状腺癌。KIF5B-RET 融合蛋白具有激酶活性,能够激活细胞信号传导通路,促进肿瘤生长和转移。因此,KIF5B-RET 融合蛋白被认为是肿瘤的一个重要驱动因子,也是潜在的治疗靶点。BA/F3 细胞是一种依赖于白细胞介素-3 (IL-3) 的前体 B 细胞,而一些蛋白激酶可以代替 IL-3 使 Ba/F3 细胞依赖性生长,再使用抑制剂拮抗此作用,因此可利用此作用进行激酶抑制剂的研究。

二、包装、运输及储存

1. 细胞系产品干冰运输, -196°C 以下(冰箱或液氮的气相)长期储存。
2. 接触产品请带手套。请收到产品立即确认产品是否为冻存状态, -196°C 以下(冰箱或液氮的气相)长期储存。
3. 本产品相关实验,应在二级生物安全实验室或生物安全柜中进行。

三、验证结果

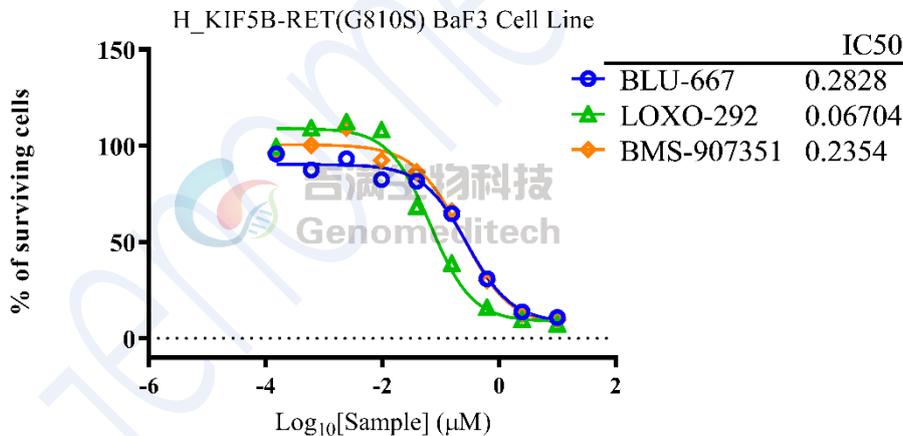


Fig 1. H_KIF5B-RET(G810S) BaF3 Cell Line 使用 BLU-667、LOXO-292、BMS-907351 杀伤验证结果。计算方法:活细胞百分比=(加药孔-assay buffer 孔)/(不加药孔-assay buffer 孔)

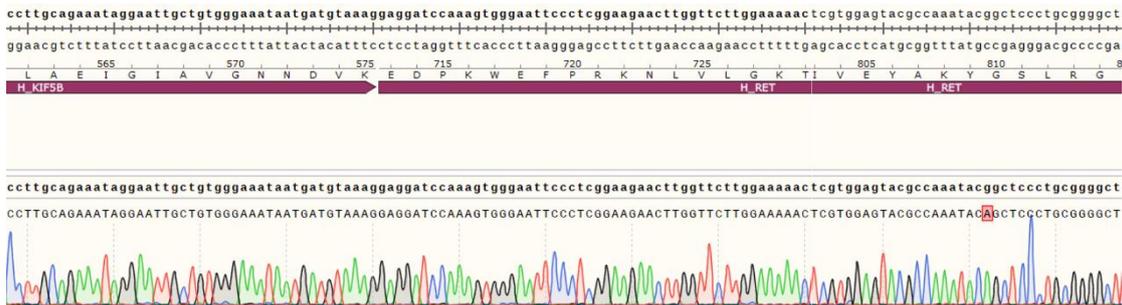


Fig 2. Sanger 测序结果

四、 培养条件及试剂材料

细胞复苏培养基:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S
细胞生长培养基:	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S+0.25 µg/mL Puromycin
细胞冻存液:	90% FBS+10% DMSO
Assay Buffer	RPMI 1640+10% FBS+1% P.S

Reagent	Specification	Manufacturer/Catalogue No.
Puromycin	25 mg	Genomeditech/GM-040401-1
Fetal Bovine Serum	500 mL	Cegrogen biotech/A0500-3010
RPMI 1640	500 mL	Viva Cell/C3010-0500
96 Well Clear V-Bottom Tissue Culture	96-well	Corning/3894
96 well round well culture plate	96-well	NEST/701001
96 well White Flat Bottom Polystyrene Not Treated Microplate	96-well	Corning/3912
GMTiter™ Luminescent Cell Viability Assay	/	Genomeditech/GM-040504
Pralsetinib (BLU-667)	10mM (1mL in DMSO)	Selleck/S8716
Cabozantinib (BMS-907351)	10mM (1mL in DMSO)	Selleck/S1119
Selpercatinib (LOXO-292)	10mM (1mL in DMSO)	Selleck/S8781

五、 细胞复苏、传代、冻存

1) 细胞复苏

- 37°C水浴锅预热复苏培养基，加入预热后的复苏培养基 5 mL 至 15 mL 离心管。
- 从液氮中取出冻存细胞并迅速放入 37°C恒温水浴锅，将细胞液面浸至水面以下不断摇动至融化（通常 2-3 分钟）。
- 用 70%乙醇擦拭冻存管外部以降低污染的几率。在生物安全柜或超净台中将冻存管中的细胞悬液转移到步骤 a) 的离心管中，轻轻混匀， $176 \times g$ ，离心 3min，使细胞沉淀，弃上清。
- 使用 1 mL 复苏培养基重悬细胞沉淀，可取出部分使用台盼蓝染色计数活细胞，活细胞 $\geq 3 \times 10^6$ cells/mL。
- 调整活细胞密度到 $3-5 \times 10^5$ cells/mL，将细胞悬液接种至 1-2 个 T25 中（3-5 mL，培养面积 25 cm²），竖瓶培养。

3) 细胞冻存

- 使用 $176 \times g$ ，3 min 离心收集细胞。
- 使用预冷细胞冻存液（90% FBS + 10% DMSO）重悬细胞，细胞密度调整为 5×10^6 cells/mL，每管 1 mL 分装到细胞冻存管中。
- 拧紧盖子，适当标记后，将冻存管置于梯度降温盒中，-80°C下保存至少 1 天，尽快转移至液氮中。

2) 细胞传代

注：细胞复苏后的 1 至 2 代，使用复苏培养基，待细胞状态稳定后，再更换为含有抗生素的生长培养基。

- 细胞为小鼠原 B 细胞，悬浮生长。
- 首次复苏后，约 48-72 h 可进行第一次传代，此次传代后细胞培养基可调整为添加抗生素的生长培养基。若 48 h 未传代，建议适当补加复苏培养基，瓶体改为横向放置。
- 推荐细胞接种密度在 $3.5-4.5 \times 10^5$ cells/mL，当细胞浓度达到 $1-1.2 \times 10^6$ cells/mL 时进行传代，1 传 3-1 传 5, 2-3 天传代，不要让其浓度超 1.4×10^6 cells/mL，推荐使用 T25 瓶进行传代培养，也可通过计数控制细胞传代密度。
- 该细胞为悬浮细胞，传代时推荐使用【半换液法】对细胞状态较为有利。传代时可以直接向培养瓶中添加生长培养基，然后将细胞吹打均匀后移入新的 T25 培养瓶中继续培养。

注意事项：

- 细胞倍增率稳定后再用于检测或冻存，一般在 7-10 天左右。常规的稳定倍增率是 24 ± 8 小时。
- 首次传代时注意营养，不处理时务必隔天适当补加复苏培养基。

使用许可协议:

吉满生物将其许可材料的所有知识产权, 独占的、不可转让的和不可发放分许可的权利授予给被许可人; 吉满生物将保留许可材料、细胞系历史包、子代、包括修改材料中许可材料的所有权。

在吉满生物和被许可方之间, 被许可方除用于 CRISPR-Cas9 实验外, 不允许以任何方式修改细胞系。被许可方不得分享、分发、出售、再授权或以其他方式将被许可材料、子代提供给其它实验室、部门、研究机构、医院、大学或生物技术公司等第三方非基于外包被许可人的研究目的而使用。

详情请参考吉满细胞系授权协议。

Genomeditech