

HEK-293 AAVS1-Attp-KI Clone Cell

产品说明书

1. 背景

1.1 AttP 位点介绍

attP 位点（噬菌体附着位点，Phage Attachment Site）是丝氨酸整合酶系统（如 ϕ C31 整合酶）中进行位点特异性重组的两个关键 DNA 序列之一，另一个是 attB 位点（细菌附着位点，Bacterial Attachment Site），attP 位点由核心区和臂（p 和 p'）组成，核心区位于序列中央，是重组发生的确切位置，两条 DNA 链在此处进行交换，attP 和 attB 位点共享一个短的核心序列（约 18 个碱基对），这是它们相互识别的基础。核心区的两侧是被称为“臂”的序列，它们含有不完美的反向重复序列，是整合酶蛋白结合并启动重组的关键结构。

1.2 AAVS1 位点介绍

AAVS1 位点（腺相关病毒整合位点 1，Adeno-Associated Virus Integration Site 1）是人类基因组中的“安全港”基因座，常被用作外源基因的稳定“停靠点”，它位于人类第 19 号染色体（位置 19q13.42）的 PPP1R12C 基因内含子内部。研究表明，即使外源基因插入破坏了 PPP1R12C 基因位点，也不会对细胞造成已知的不良影响，因此被认为是一个安全的插入位点。这显著降低了随机基因整合带来的潜在风险，如原癌基因激活或抑癌基因失活。

1.3 attP 位点在基因敲入细胞系构建中的作用

通过 CRISPR/Cas9 基因敲入技术在基因组特定位置插入 attP 位点，建立一个“停靠港”，随后，只要将带有 attB 位点和目的基因的载体导入细胞，在 ϕ C31 整合酶的作用下，目的基因就能精确、高效地整合到预先设好的 attP 位点上，实现稳定的基因表达，实现基因定点敲入，尤其在长片段基因敲入实验中有很大的优势。

基恩科生物利用 CRISPR/Cas9 技术将 attP 位点敲入在 AAVS1 基因安全港构建细胞模型，细胞模型可用于下游基因 AAVS 敲入实验研究。（Bxb1 attP 序列：ggtttgtctgtgtcaaccaccgcggtctcagtggtgtacggtacaacc）

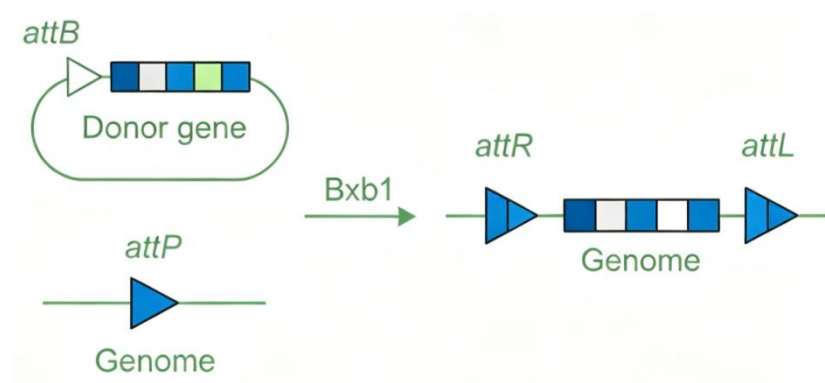


图 1 HEK-293 AAVS1-AttP-KI Clone Cell 基因敲入应用原理图

2. HEK-293 AAVS1-AttP-KI 细胞系验证结果

2.1 HEK-293 AAVS1-AttP-KI 细胞系验证方法-Sanger 测序

AttP 位点两侧设计检测引物，进行 PCR 扩增，扩增产物进行 Sanger 测序，通过测序检测单克隆细胞株敲入。

位点引物名称	引物序列	产物大小
--------	------	------

附录：HEK-293 AAVS1-AttP-KI Clone Cell 细胞培养方法

1. 培养条件

1) 完全培养基成分：DMEM+10%FBS+1%P/S

2) 培养环境：37℃、5%CO₂

3) 传代比例：1:2~1:4

4) 传代频次：2~3 天传代一次

5) 冻存条件：冻存液：90%FBS+10%DMSO 温度：液氮

2. 细胞培养

2.1 细胞复苏

2.1.1 从液氮罐或者-80℃冰箱取出细胞冻存管，并迅速将冻存管置于 37℃水浴中来回晃动，迅速解冻。为避免污染，可将冻存管置于干净的一次性 PE 手套内再置于水浴中。

2.1.2 待冻存管中液体融化后，立即取出，并用 75%酒精纱布擦拭冻存管表面。

2.1.3 将冻存管置于生物安全柜中，并将冻存管中的液体转移到含有约 9mL 完全培养基的离心管中，300g，5min 离心，弃上清。

2.1.4 用适量的完全培养基重悬细胞并转移到新的培养瓶中，并将细胞置于 5% CO₂、37℃恒温培养箱静置培养。

2.2 细胞传代

2.2.1 当细胞密度达到 80%以上时，可以进行传代，传代比例 1:2~1:4，2~3 天传代一次。具体操作如下：

2.2.2 吸取并弃掉培养瓶中培养基，加入适量 PBS，轻轻晃动润洗细胞，然后将 PBS 吸出。

2.2.3 加入约 1.0 mL 0.25%胰酶，轻轻晃动浸润细胞，然后放在培养箱内消化 2~3 分钟，在显微镜下观察发现细胞变圆，轻轻拍打瓶壁观察到 80%细胞从壁上脱落分离时即可加入约 5ml 完全培养基中和胰蛋白酶。并轻轻吹打将细胞从培养瓶表面吹落使细胞分散成单细胞悬液。（此处为 T75 培养瓶所用体积，可根据实际情况增减用量）。

2.2.4 将终止消化后的细胞悬液转移至干净的 15ml 离心管中，300g，5min 离心，弃上清。

2.2.5 用适量的完全培养基重悬细胞，并按照传代比例（推荐**传代比例 1: 2~1: 4**）转移到新的培养瓶中，并将细胞置于 5% CO₂、37℃恒温培养箱静置培养。

2.3 细胞冻存

细胞汇合度达到 80%-90%时可进行细胞冻存操作。自制冻存液成分：90%FBS+10%DMSO，为保证冻存细胞较高活力，冻存液最好提前配制并置于 4℃冰箱预冷。

细胞冻存具体操作如下：

2.3.1 吸取并弃掉培养瓶中培养基，加入适量 PBS 洗涤一次。

2.3.2 加入约 1.0 mL 0.25%胰酶，轻轻晃动浸润细胞，然后放在培养箱内消化 2~3 分钟，在显微镜下观察发现细胞

变圆，轻轻拍打瓶壁观察到 80%细胞从壁上脱落分离时即可加入约 5ml 完全培养基中和胰蛋白酶。并轻轻吹打将细胞从培养瓶表面吹落使细胞分散成单细胞悬液。（此处为 T75 培养瓶所用体积，可根据实际情况增减用量）。

2.3.3 将终止消化后的细胞悬液转移至干净的 15ml 离心管中，300g，5min 离心，弃上清。

2.3.4 根据细胞沉淀量加入适量提前配制好并预冷的细胞冻存液（推荐 1 个 T75 培养瓶的细胞可加入 3ml 冻存液），轻轻吹打使细胞分散。

2.3.5 将细胞悬液转移至细胞冻存管中，1ml/管。冻存管需提前写好标签或者贴好标签。标签信息包含细胞名称，代数，冻存时间及操作人员姓名等。

2.3.6 将细胞冻存管置于细胞程序降温盒中，并将盒子置于-80℃冰箱中过夜。过夜后可将冻存管转移至液氮罐中长期保存。