



## 293T-TYNE 细胞说明书

货号: C1208

培养基: DMEM (gibco 货号: 12100-061) 高糖培养基+10%胎牛血清

消化液: 0.25%胰蛋白酶, 0.53mM EDTA

冻存液: 50%胎牛血清, 40%DMEM, 10%DMSO

培养条件: 37°C, 5% CO<sub>2</sub>

### 细胞简介:

293T-TYNE细胞的基因组稳定整合了含有起始密码子移位突EGFP基因。在未发生DNA 剪切和突变时不能有效表达EGFP 蛋白, 仅有少量本底荧光表达。核酸酶对突变EGFP 5' 端DNA切割后, DNA 断裂引发的NHEJ 修复 作用即可实现对EGFP 蛋白的修复, 从而产生荧光。通过荧光细胞数量多少, 可以直观反映基因敲除效率的高低。该细胞株可以用于CRISPR/Cas9、TALEN 或ZNF 基因敲除载体的切割活性验证。

### 细胞特性:

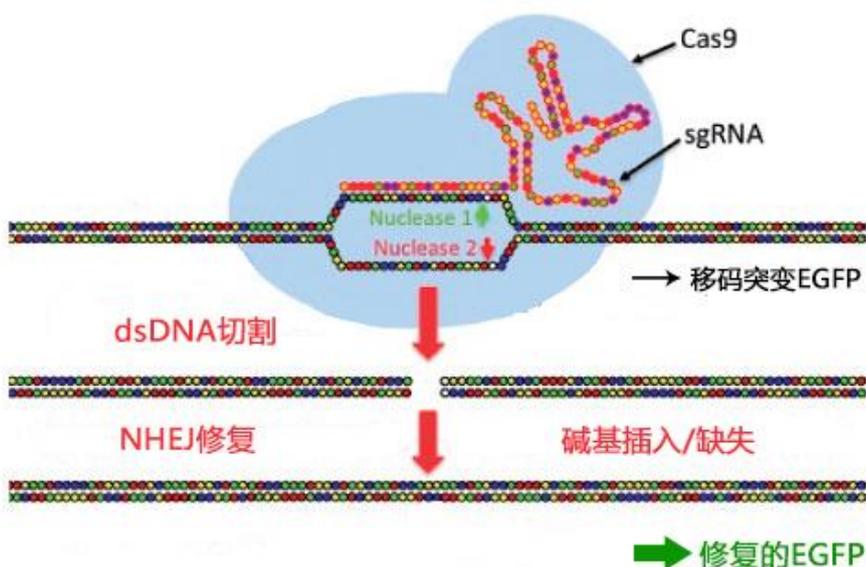
表达基因: TYNE

基因导入方法: 慢病毒

筛选抗生素: puromycin

细胞克隆: 多克隆细胞株

### 原理示意:



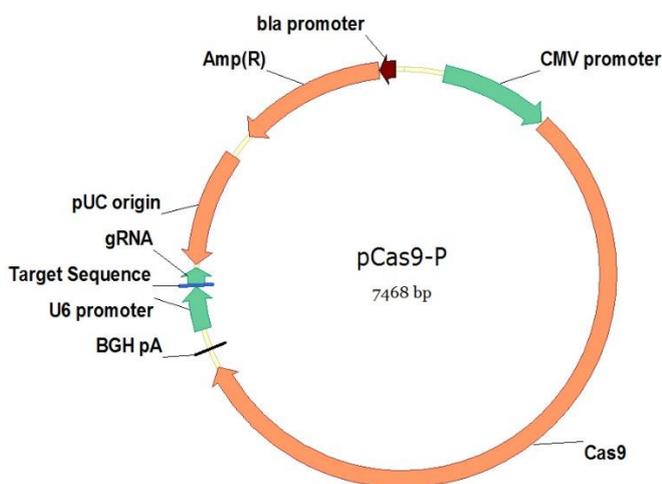
**TYNE 启动子及阳性对照切割靶点序列:**

```

... CMV promoter→
...GCAAATGGGCGGTAGGCCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATC
                                     P 靶点
CGCTAGCCGAAGATGCCACCATGGGCCACCATGGCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCG
CGGGCCCGGGATCCTAGGGATAACAGGGTAATAGAAGCGGTGGGTCTGGCGGGAGGATCTGCGGCCGCAT

EGFP coding sequence→
GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC GGG GTG GTG CCC ATC CTG GTC GAG CTG GAC
GGC GAC GTA AAC GGC CAC AAG TTC AGC GTG TCC GGC GAG GGC GAG GGC GAT GCC ACC
TAC GGC AAG CTG ACC CTG AAG TTC ATC TGC ACC ACC GGC AAG CTG CCC GTG CCC TGG
CCC...
    
```

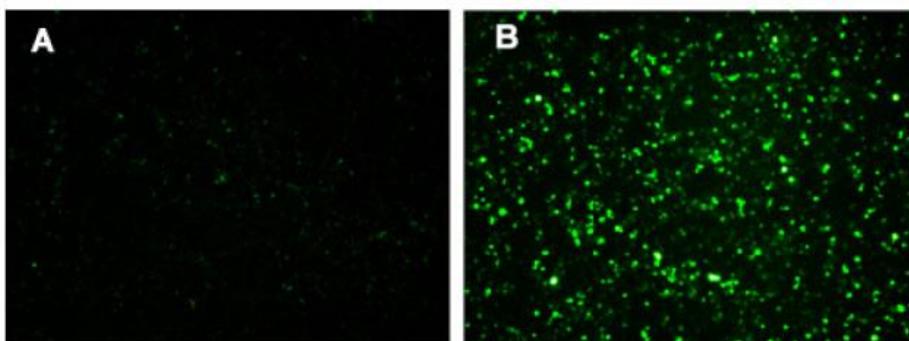
**配套阳性对照载体图谱:**



阳性对照靶序列: CTTCGAATTCTGCAGTCGA

**功能验证:**

pCas9-P 及阴性对照 pCas9-N 分别转染 293T-TYNE 细胞株, 转染后 72h 荧光显微镜观察细胞荧光。A 转染 pCas9-N; B 转染 pCas9-P。



**使用注意事项:**

- 1、293T-TYNE 细胞采用嘌呤霉素筛选得到, 表达嘌呤霉素抗性基因, 而 HEK293T 细胞本身对 G418 有较高抗性, 因此后续细胞筛选实验中不能采用这两种抗生素。

- 
- 2、一般切割成功后 48h 能检测到绿色荧光，延长检测时间至 72 小时荧光更加明显。
  - 3、靶点设计务必位于两个 ATG 起始密码子之后、EGFP 编码序列之前。

**细胞培养注意事项：**

- 1、293T-TYNE 细胞对血清要求较高，采用高质量胎牛血清进行培养十分必要，我们采用 GIBCO 和 HYCLONE 的胎牛血清培养均能获得满意效果。*切勿*用新生牛血清或劣质胎牛血清培养。
- 2、在细胞培养早期大量冻存细胞十分必要。
- 3、293T-TYNE 细胞传代培养中应保证细胞密度不高于 80%，低密度传代对保持细胞状态极为重要。

---

### 收到细胞的处理:

根据客户所在地及发货季节, 我们可能采用干冰运输的冻存细胞或者常温运输的培养瓶细胞两种不同形式发货。收到细胞后根据细胞运输类型采用下面两种方式操作。

#### 干冰运输细胞:

- 1、37°C 水浴融化细胞冻存液, 间或摇动冻存管以加速融化过程。待细胞冻存液完全融化后, 用 70%乙醇消毒细胞冻存管外壁。
- 2、室温, 2500rpm 离心 5min, 吸去冻存液。
- 3、在冻存管中加入 1ml 培养基, 轻轻吹吸, 重悬细胞。
- 4、将细胞接种到 25cm 培养瓶, 补足培养基到 5ml, 37°C 5%CO<sub>2</sub> 培养。

#### 常温运输细胞:

在显微镜下观察已收到的细胞, 根据细胞状态采取不同方法处理。

- A. 如果细胞大部分贴壁且密度不高, 则去除细胞原培养基, 加入 5ml 新鲜培养基即可。
- B. 如果细胞大部分贴壁且密度较高, 则按照常规方法消化细胞, 传代分瓶培养。
- C. 如果细胞脱落较多, 采用下面步骤处理:
  - 1) 将原培养基析出装入 50ml 离心管。200g 离心 10 分钟。
  - 2) 去除上清, 用 5ml 培养基重悬细胞, 将细胞重悬液接入一新的 10cm 培养皿培养。
  - 3) 在原细胞培养瓶中重新添加 5ml 培养基进行培养。
  - 4) 第二天视细胞密度和状态, 换液或传代。

### 细胞传代:

为保持细胞良好的状态, 细胞密度达 70%以上时就需要传代。由于细胞生长迅速, 一般 2-3 天需传代一次。

**注意: 及时传代对保持细胞状态极为重要。**

以 25cm 培养瓶传代为例。

- 1、传代前将细胞培养液、PBS 和胰蛋白酶温浴到 37°C。
- 2、吸去细胞培养液。
- 3、用 PBS 漂洗 1 到 2 次。
- 4、加入 3ml 胰蛋白酶, 轻轻晃动细胞瓶, 使胰蛋白酶均匀覆盖细胞。吸去胰蛋白酶, 将培养瓶放置在细胞培养箱中, 37 摄氏度消化。由于配制的胰蛋白酶活力有差别, 消化时间可用 30 秒到 1 分 30 秒。应在倒置显微镜下观察, 看到细胞分开及稍微变圆即可, 过度消化可能导致部分细胞贴壁困难。
- 5、加入 5ml 细胞培养基, 用吸管轻柔吹打分散细胞。
- 6、按 1:4 到 1:5 接种细胞。

### 细胞冻存:

- 1、将细胞培养液、PBS 和胰蛋白酶和冻存液温浴到 37°C。
- 2、冻存的细胞应为状态好, 生长旺盛的细胞。
- 3、按细胞传代方法消化细胞, 用适量细胞培养液终止消化, 重悬细胞。
- 4、室温 2500rpm 离心 10 分钟收集细胞, 用冻存液重悬细胞, 并调节浓度至大约  $1 \times 10^6$  个细胞/ml。分装到细胞冻存管。
- 5、将细胞冻存管放入程序降温盒, -80°C 过夜。
- 6、将冻存的细胞转入液氮中。