

合同编号: 20211025SPO02A01011

技术服务合同

项目名称: 基于 CRISPR/Cas9 技术靶向 ULK1 复合物及 CD3Z
标签敲入细胞株构建技术服务

委托方(甲方): 深圳先进技术研究院
课题组负责人: 施小山
项目联系人: 施小山
联系电话: 13917714443
电子邮箱: xs.shi@siat.ac.cn
通讯地址: 深圳市南山区西丽深圳大学城学苑大道 1068 号 E802

受托方(乙方): 上海派致生物科技有限公司
项目联系人: 金梦菲
联系电话: 021-59541298 手机: 19921134547
电子邮箱: jinmf@pregen.cn
通讯地址: 上海市嘉定区兴贤路 1180 号 5 幢 204 室





依据《中华人民共和国合同法》的规定，合同双方就乙方为甲方提供专项技术服务，甲方向乙方支付相应技术服务报酬，经平等友好协商，签订本合同。

1. 项目内容

利用 CRISPR/Cas9 技术结合慢病毒感染的方式，在 TCR 重构 Jurkat 76 细胞中靶向 ULK1 复合物（ULK1、ATG13、ATG101 及 RB1CC1）在其 N 端敲入 Twin-Strep 标签，通过单克隆筛选获得目的基因敲入的细胞株。利用 CRISPR/Cas9 技术结合慢病毒感染的方式，在 TCR 重构 Jurkat 76 细胞中靶向 CD3Z 在其 C 端敲入 Twin-Strep 标签，通过单克隆筛选获得目的基因敲入的细胞株。（详见附件一、二、三、四、五）

2. 项目周期

- 2.1. 完成本合同中所承诺的技术服务内容所需时间为：15-22 周*。（详见附件一、二、三、四、五）
- 2.2. 项目周期的起始时间定义为：乙方收到甲方项目款且收到甲方细胞之日，如遇甲方提供细胞不符合实验要求需重新寄送的，则按收到符合要求细胞之日作为项目起始日。
- 2.3. 经双方同意变更实验方案的，项目周期按新方案执行，起始日为双方确认新方案之日。
- 2.4. 因甲方要求项目暂停或中止以及乙方等待甲方反馈所花费的时间不包括在项目周期承诺的时间内。

*备注：本周期适用于细胞株一次性成功构建情况，因本项目的难度系数较大，第一次的构建可能仅能获得杂合子，在甲方允许的情况下，将在杂合子的基础上进行第二次构建。

3. 交付与验收

- 3.1. ULK1 基因 N 端定点敲入 TagBFP-T2A-TwinStrep 表达元件的 Jurkat 76 单克隆细胞株，（每株细胞约 1×10^6 个/支 $\times 2$ 支，冻存细胞）；
- 3.2. ATG13 基因 N 端定点敲入 TagBFP-T2A-TwinStrep 表达元件的 Jurkat 76 单克隆细胞株，（每株细胞约 1×10^6 个/支 $\times 2$ 支，冻存细胞）；
- 3.3. ATG101 基因 N 端定点敲入 TagBFP-T2A-TwinStrep 表达元件的 Jurkat 76 单克隆细胞株，（每株细胞约 1×10^6 个/支 $\times 2$ 支，冻存细胞）；
- 3.4. RB1CC1 基因 N 端定点敲入 TagBFP-T2A-TwinStrep 表达元件的 Jurkat 76 单克隆细胞株，（每株细胞约 1×10^6 个/支 $\times 2$ 支，冻存细胞）；

网址：www.pregen.cn

电话：400-661-1162

邮箱：info@pregen.cn

- 3.5. CD247 基因 C 端定点敲入 TwinStrep-T2A-TagBFP 表达元件的 Jurkat 76 单克隆细胞株，
(每株细胞约 1×10^6 个/支 $\times 2$ 支，冻存细胞)；
- 3.6. 项目报告及原始数据。

4. 双方责任

- 4.1. 甲方须真实、准确、及时地提供项目所需的相关信息（目的细胞中英文名称、来源、生长方式、培养条件、目的基因名称、NCBI 号、基因已知功能等）和材料（目的细胞、特殊培养基、添加因子等），因提供信息错误、不充分、不及时或材料不符合标准所造成的后果，由甲方承担。
- 4.2. 甲方须确保所提供的材料符合生物安全标准，合同生效时默认甲方对样品的安全性做出承诺，若因细胞等具致病性从而威胁到公共安全，甲方需承担相应的一切责任。
- 4.3. 甲方对所提供的细胞来源及使用须符合相关法律法规及伦理，乙方仅在本合同框架内，根据甲方要求对细胞进行相关实验操作，因甲方违反相关法律法规及伦理获取、使用组织/细胞所导致一切后果，由甲方承担，与乙方无关。
- 4.4. 甲方承诺，本技术服务产物仅用于科学研究，因用于其他用途所产生的一切后果，由甲方承担。
- 4.5. 甲方在使用本合同项下由乙方提供的技术服务产物时，应注明来源“上海派致生物科技有限公司”或“Shanghai Pregon Biotechnology Co., Ltd”。
- 4.6. 如因甲方原因造成合同终止，甲方应向乙方支付实际已发生费用。
- 4.7. 乙方需秉持客观真实的基本科学原则并确保按照合同执行标准进行相关实验，在指定期限内向甲方提供符合质量标准的技术服务产物，并提交相关报告。
- 4.8. 乙方在首次实验后未获得相应技术服务产物时，将重复实验一次，并提供相应实验数据。因客观原因（如编辑目的基因后影响细胞增殖、存活等）导致最终无法获得技术服务产物时，甲方可要求变更方案（如有）或项目，并按新方案或项目标准履行付款义务。
- 4.9. 乙方承诺在尽可能短的时间内完成本合同内容，如提前完成，乙方将按标准提前交付相应技术服务产物及报告；如遇特殊情况未能按时交付的，经甲方同意，双方可以协商确定适当延长项目周期。
- 4.10. 乙方在寄出细胞后，将继续为甲方保存细胞和相应数据 6 个月；若甲方要求保存更长时间或再次寄送的，需提前告知乙方并支付相应费用。

5. 费用及付款方式

5.1. 本次技术服务合同总金额：人民币贰拾万捌仟元整（¥208,000），具体为：

项目	金额（元）	折后金额（元）
ULK1 基因 N 端定点敲入 TagBFP-T2A-TwinStrep Jurkat 76 细胞株	52000	41600
ATG13 基因 N 端定点敲入 TagBFP-T2A-TwinStrep Jurkat 76 细胞株	52000	41600
ATG101 基因 N 端定点敲入 TagBFP-T2A-TwinStrep Jurkat 76 细胞株	52000	41600
RB1CC1 基因 N 端定点敲入 TagBFP-T2A-TwinStrep Jurkat 76 细胞株	52000	41600
CD247 基因 C 端定点敲入 TwinStrep-T2A-TagBFP Jurkat 76 细胞株	52000	41600
合计	260000	208000

5.2. 甲方分期两次向乙方支付相应费用，具体支付方式和时间为：

- (1) 合同生效之日起 20 个工作日内，甲方把相当于合同金额的 70% 项目款，计人民币壹拾肆万伍仟陆佰元整（¥145,600） 转入乙方帐户；
- (2) 甲方在收到乙方交付结果的 20 个工作日内，把相当于合同金额的 30% 项目款，计人民币陆万贰仟肆佰元整（¥62,400） 转入乙方帐户。

5.3. 乙方账户信息：

收款单位：上海派致生物科技有限公司

开户银行：中国建设银行股份有限公司上海嘉定南门支行

帐号：31050179450000000257

支付方式：电汇或转账

5.4. 甲方开票信息：

公司名称：深圳先进技术研究院

税 号：1244030078922035X0

开户银行：中国银行股份有限公司前海蛇口分行

银行账号：769257931168

开票地址：广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号

电 话：0755-86392018

6. 保密条款

1. 甲乙双方对本合同的所有内容，包括但不限于技术服务产物、原始资料、技术路线、实验报告、服务价格等具有保密义务。
2. 保密期限：自合同生效日起3年。

7. 合同解除

缔约双方约定，出现下列情形，致使本合同的履行成为不必要或不可能的，可以解除本合同：

- 7.1. 因不可抗力因素，如自然灾害、战争、罢工、国家政治经济环境发生变化和其他不可预见及不可避免的情况发生导致乙方延期完成合同或不能完成合同时，乙方可免除责任。在上述情况下，乙方将及时通知甲方，采取必要措施并与甲方协商解决。
- 7.2. 因对方违约使合同不能继续履行或没有必要继续履行。

8. 争议解决

因履行本合同所发生的或与本合同有关的一切争议、纠纷，双方应友好协商解决，协商不成的，可向乙方所在地仲裁机构提起仲裁。仲裁裁决是终局的，对双方均有约束力。

9. 一般条款

- 9.1. 本合同一式二份，甲乙双方各执一份，具有同等效力，自双方授权代表签字盖章后生效。
- 9.2. 本合同未尽事宜，双方可签订补充协议。本合同的补充协议为其不可分割的一部分，与本合同具有同等法律效力。

(以下无正文)

(以下无正文，本页为合同签字页)



甲方：深圳先进技术研究院

乙方：上海派致生物科技有限公司

代表签字/盖章：

代表签字/盖章：

年 月 日

年 月 日

附件一：《ULK1 基因 N 端定点敲入 TagBFP-T2A-TwinStrep 表达元件的 Jurkat 76 细胞株构建方案》

附件二：《ATG13 基因 N 端定点敲入 TagBFP-T2A-TwinStrep 表达元件的 Jurkat 76 细胞株构建方案》

附件三：《ATG101 基因 N 端定点敲入 TagBFP-T2A-TwinStrep 表达元件的 Jurkat 76 细胞株构建方案》

附件四：《RB1CC1 基因 N 端定点敲入 TagBFP-T2A-TwinStrep 表达元件的 Jurkat 76 细胞株构建方案》

附件五：《CD247 基因 C 端定点敲入 TwinStrep-T2A-TagBFP 表达元件的 Jurkat 76 细胞株构建方案》

附件一



<项目方案>

归口部门：市场部

文件类别：资料文件

文档编号< PG-MD-INF-061-2021-1.0 >

控制状态：非受控文件

编制人：曾洋

日期：20211025

项目方案

项目目的

利用 CRISPR/Cas9 同源重组技术构建在 ULK1 基因 N 端定点敲入 TagBFP-T2A-TwinStrep 表达元件的 Jurkat 76 细胞株。

基因信息

基因名称: ULK1 unc-51 like autophagy activating kinase 1 [Homo sapiens (human)]

NCBI ID:8408, updated on 17-Oct-2021

别名: ATG1; ATG1A; UNC51; hATG1; Unc51.1

NM 号: NM_003565.4

插入表达元件: **TagBFP-T2A-TwinStrep** 标签

元件序列:

```

ATGAGCGAGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGTACATGGAGGGCACCGTGGACAACCATCA
CTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAGACCATGAGAATCAAGGTGG
TCGAGGGCGGCCCTCTCCCCTTCGCCTTCGACATCCTGGCTACTAGCTTCCTCTACGGCAGCAAGACCTT
CATCAACCACACCCAGGGCATCCCCGACTTCTTCAAGCAGTCCTTCCCTGAGGGCTTCACATGGGAGAG
AGTCACCACATACGAAGACGGGGCGTGTGCTGACCGTACCCAGGACACCAGCCTCCAGGACGGCTGCCT
CATCTACAACGTCAAGATCAGAGGGGTGAACTTACATCCAACGGCCCTGTGATGCAGAAGAAAACACT
CGGCTGGGAGGCCTTCACCGAGACGCTGTACCCCGCTGACGGCGGCCTGGAAGGCAGAAACGACATGG
CCCTGAAGCTCGTGGGCGGGAGCCATCTGATCGCAAACGCCAAGACCACATATAGATCCAAGAAAACCCG
CTAAGAACCTCAAGATGCCTGGCGTCTACTATGTGGACTACAGACTGGAAAGAATCAAGGAGGCCAACA
ACGAGACCTACGTCGAGCAGCAGAGGTGGCAGTGGCCAGATACTGCGACCTCCCTAGCAAACCTGGGGC
ACAAGCTTAATGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGCCCAAGCTA
GCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAGAAAGGTGGAGGTGCCCCGAGGTGGATCGGGAGGTGGATCGTGGAGC
CACCCGCAGTTCGAAAAAGGATTTCGATTACAAGGATGACAAGGGTACC
    
```

备注: 根据客户需求, 在 ULK1 (NM_003565.4) 转录本的 N 端起始密码子处插入 TagBFP-T2A-TwinStrep 元件, 插入元件长度为 873bp, TagBFP-T2A-TwinStrep 在内源 ULK1 基因的调控下表达。

细胞信息

细胞名称: Jurkat 76; 人 T 淋巴细胞

ATCC 编号: /

生长方式: 悬浮

完全培养基配方: **RPMI-1640+10%FBS** (待客户确认)

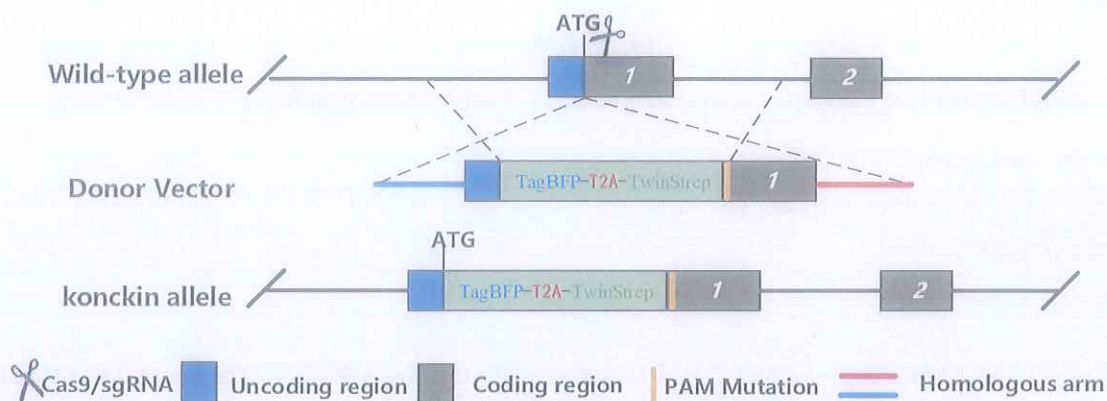
培养条件 (默认): 37°C, 5% CO₂

细胞来源: 客户提供

技术原理

本项目采用 CRISPR/Cas9 技术对内源 ULK1 基因进行修饰。针对目的基因的插入位点, 设计对应的 sgRNA, 体外转录 sgRNA, 筛选有效的 sgRNA, 并构建含有对应同源臂的 Donor 质粒作为修复模板, 利用设计的特异性 sgRNA, 指导 Cas9 对目的位点进行切割, 引起 DNA 双链断裂, 通过同源重组的方式将 TagBFP-T2A-TwinStrep 插入指定位点, 通过 TagBFP 标签筛选出阳性单克隆细胞, 对筛选出的单克隆细胞进行 PCR 及测序鉴定, 确定目的修饰位点序列正确。

方案策略示意图：



项目流程

第一步：目的细胞检测

对目的细胞进行基因型、支原体、转染效率、单克隆形成效率以及 STR 鉴定等检测。

第二步：sgRNA 设计与筛选

在 ULK1 (NM_003565.4) 转录本的 N 端位点附近设计 sgRNA，筛选出切割效率高的 sgRNA。

第三步：构建 Cas9-sgRNA 共表达质粒和 Donor 质粒

将筛选出的 sgRNA 与 Cas9 构建共表达质粒，携带 mCherry 筛选标记；根据筛选出来的 sgRNA，进行 Donor 载体的构建，在 TagBFP-T2A-TwinStrep 表达元件两端加 600~800bp 左右的同源臂。

第四步：目的细胞转染与筛选

将 Cas9/sgRNA 和 Donor 质粒转染目的细胞，通过流式分选筛选出阳性单克隆细胞，并进行扩增。

第五步：基因型鉴定

对筛选出的单克隆细胞进行 PCR 及测序鉴定，确定目的修饰位点序列正确。

第六步：产物与报告交付

将构建成功的目的细胞进行扩增，并进行支原体检测等质量控制，冻存并寄送细胞，同时撰写报告一并交付。

项目周期

预实验阶段	时间(周)	项目内容
单克隆形成	2-4	检测细胞单克隆形成能力
转染效率	1-2	检测细胞转染效率
支原体检测	1-2	检测细胞是否存在支原体污染
细胞基因型检测	1-2	测序检测细胞突变位点基因型
细胞 STR 鉴定	2	检测细胞是否存在交叉污染
细胞活性检测	1-2	利用台盼蓝染色法检测细胞活性
合计	3-4 周	
正式实验阶段	时间(周)	项目内容
载体设计、构建及验证	3-4	设计并构建 sgRNA 质粒、转染细胞并对 sgRNA 切割

		效率进行验证, 构建 Donor 质粒
目的细胞转染与单克隆筛选	6-8	转染目的细胞、通过筛选标记进行阳性单克隆细胞筛选并进行细胞扩增
细胞鉴定与扩增	2-4	单克隆细胞 PCR 及测序鉴定, 并进一步扩增
质量控制	1-2	质量控制、交付准备
合计:	12-18	

注意事项

- 1) 方案周期是以 2-3 天传代 1 次的细胞系为参考计算, 若增殖较慢的细胞系, 需增加周期。
- 2) 经预实验确认细胞有单克隆形成能力、瞬转效率符合标准、基因型正确、无支原体污染、无细胞系污染的前提下, 可按现有方案进行正式实验。如预实验情况不符合预期, 则甲乙双方可协商更改方案。
- 3) 初步预测符合的 sgRNA 数量有限 (2 条), 存在筛选不到可用 sgRNA 的风险。
- 4) 采用 CRISPR/Cas9 技术切割 DNA, 构建后细胞株需将 sgRNA 识别位点的 PAM 序列进行同义突变, 以阻止 Cas9 对 Donor 载体中序列产生切割。若 PAM 不能进行同义突变, 选择同义突变靠近 PAM 10bp 之内的碱基。
- 5) 该方案通过在 ULK1 基因 N 端通过插入 TagBFP-T2A-TwinStrep 标签蛋白, 该内源基因在不同的细胞株中的表达本底值不同, 可能会存在在该基因低表达细胞株中检测不到标签蛋白表达的风险。

方案二

〈项目方案〉

归口部门：市场部

文件类别：资料文件

文档编号〈 PG-MD-INF-062-2021-1.0 〉

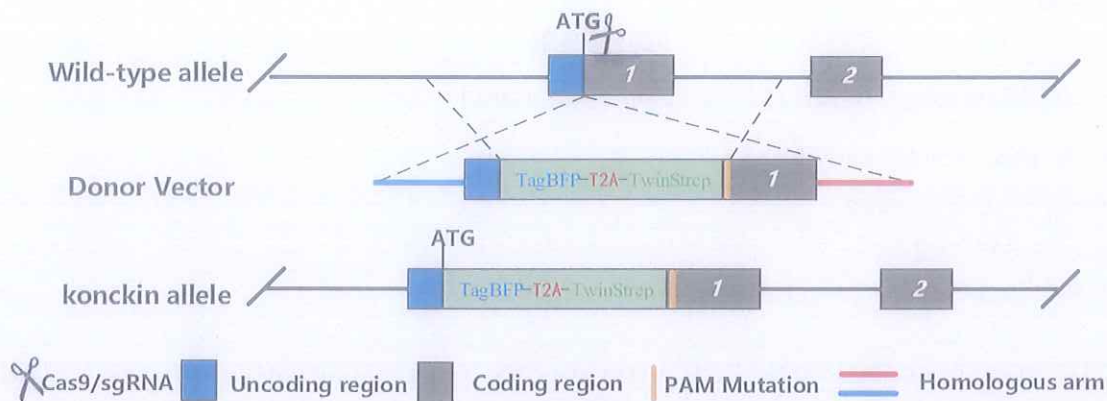
控制状态：非受控文件

编制人：曾洋

日期：20211025

项目方案	
项目目的	
利用 CRISPR/Cas9 同源重组技术构建在 ATG13 基因 N 端定点敲入 TagBFP-T2A-TwinStrep 表达元件的 Jurkat 76 细胞株。	
基因信息	
基因名称: ATG13 autophagy related 13 [Homo sapiens (human)]	
NCBI ID:9776, updated on 8-Aug-2021	
别名: KIAA0652; PARATARG8	
NM 号: NM_001346311.2	
插入表达元件: TagBFP-T2A-TwinStrep 标签	
元件序列:	
<pre> ATGAGCGAGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGTACATGGAGGGCACCGTGGACAACCATCA CTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAGACCATGAGAATCAAGGTGG TCGAGGGCGGCCCTCTCCCCTTCGCCTTCGACATCCTGGCTACTAGCTTCCTCTACGGCAGCAAGACCTT CATCAACCACACCCAGGGCATCCCCGACTTCTTCAAGCAGTCCTTCCCTGAGGGCTTCACATGGGAGAG AGTCACCACATACGAAGACGGGGGCGTGCTGACCGCTACCCAGGACACCAGCCTCCAGGACGGCTGCCT CATCTACAACGTCAAGATCAGAGGGGTGAACTTCACATCCAACGGCCCTGTGATGCAGAAGAAAACACT CGGCTGGGAGGCCTTACCGAGACGCTGTACCCCGCTGACGGCGGCCTGGAAGGCAGAAACGACATGG CCCTGAAGCTCGTGGGCGGGAGCCATCTGATCGCAAACGCCAAGACCACATATAGATCCAAGAAACCCG CTAAGAACCTCAAGATGCCTGGCGTCTACTATGTGGACTACAGACTGGAAAGAATCAAGGAGGCCAACA ACGAGACCTACGTCGAGCAGCACGAGGTGGCAGTGGCCAGATACTGCGACCTCCCTAGCAAACCTGGGGC ACAAGCTTAATGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGCCCAAGCTA GCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAGAAAGGTGGAGGTGCCCCGAGGTGGATCGGGAGGTGGATCGTGGAGC CACCCGCAGTTCGAAAAAGGATTTCGATTACAAGGATGACAAGGGTACC </pre>	
备注: 根据客户需求, 在 ATG13 (NM_001346311.2) 转录本的 N 端起始密码子处插入 TagBFP-T2A-TwinStrep 元件, 插入元件长度为 873bp, TagBFP-T2A-TwinStrep 在内源 ATG13 基因的调控下表达。	
细胞信息	
细胞名称: Jurkat 76; 人 T 淋巴细胞	
ATCC 编号: /	
生长方式: 悬浮	
完全培养基配方: RPMI-1640+10%FBS (待客户确认)	
培养条件 (默认): 37°C, 5% CO2	
细胞来源: 客户提供	
技术原理	
<p>本项目采用 CRISPR/Cas9 技术对内源 ATG13 基因进行修饰。针对目的基因的插入位点, 设计对应的 sgRNA, 体外转录 sgRNA, 筛选有效的 sgRNA, 并构建含有对应同源臂的 Donor 质粒作为修复模板, 利用设计的特异性 sgRNA, 指导 Cas9 对目的位点进行切割, 引起 DNA 双链断裂, 通过同源重组的方式将 TagBFP-T2A-TwinStrep 插入指定位点, 通过 TagBFP 标签筛选出阳性单克隆细胞, 对筛选出的单克隆细胞进行 PCR 及测序鉴定, 确定目的修饰位点序列正确。</p>	

方案策略示意图：



项目流程

第一步：目的细胞检测

对目的细胞进行基因型、支原体、转染效率、单克隆形成效率以及 STR 鉴定等检测。

第二步：sgRNA 设计与筛选

在 ATG13 (NM_001346311.2) 转录本的 N 端位点附近设计 sgRNA，筛选出切割效率高的 sgRNA。

第三步：构建 Cas9-sgRNA 共表达质粒和 Donor 质粒

将筛选出的 sgRNA 与 Cas9 构建共表达质粒，携带 mCherry 筛选标记；根据筛选出来的 sgRNA，进行 Donor 载体的构建，在 TagBFP-T2A-TwinStrep 表达元件两端加 600~800bp 左右的同源臂。

第四步：目的细胞转染与筛选

将 Cas9/sgRNA 和 Donor 质粒转染目的细胞，通过流式分选筛选出阳性单克隆细胞，并进行扩增。

第五步：基因型鉴定

对筛选出的单克隆细胞进行 PCR 及测序鉴定，确定目的修饰位点序列正确。

第六步：产物与报告交付

将构建成功的目的细胞进行扩增，并进行支原体检测等质量控制，冻存并寄送细胞，同时撰写报告一并交付。

项目周期

预实验阶段	时间(周)	项目内容
单克隆形成	2-4	检测细胞单克隆形成能力
转染效率	1-2	检测细胞转染效率
支原体检测	1-2	检测细胞是否存在支原体污染
细胞基因型检测	1-2	测序检测细胞突变位点基因型
细胞 STR 鉴定	2	检测细胞是否存在交叉污染
细胞活性检测	1-2	利用台盼蓝染色法检测细胞活性
合计	3-4 周	
正式实验阶段	时间(周)	项目内容
载体设计、构建及验证	3-4	设计并构建 sgRNA 质粒、转染细胞并对 sgRNA 切割

		效率进行验证, 构建 Donor 质粒
目的细胞转染与单克隆筛选	6-8	转染目的细胞、通过筛选标记进行阳性单克隆细胞筛选并进行细胞扩增
细胞鉴定与扩增	2-4	单克隆细胞 PCR 及测序鉴定, 并进一步扩增
质量控制	1-2	质量控制、交付准备
合计:	12-18	

注意事项

- 1) 方案周期是以 2-3 天传代 1 次的细胞系为参考计算, 若增殖较慢的细胞系, 需增加周期。
- 2) 经预实验确认细胞有单克隆形成能力、瞬转效率符合标准、基因型正确、无支原体污染、无细胞系污染的前提下, 可按现有方案进行正式实验。如预实验情况不符合预期, 则甲乙双方可协商更改方案。
- 3) 初步预测符合的 sgRNA 数量有限 (3 条), 存在筛选不到可用 sgRNA 的风险。
- 4) 采用 CRISPR/Cas9 技术切割 DNA, 构建后细胞株需将 sgRNA 识别位点的 PAM 序列进行同义突变, 以阻止 Cas9 对 Donor 载体中序列产生切割。若 PAM 不能进行同义突变, 选择同义突变靠近 PAM 10bp 之内的碱基。
- 5) 该方案通过在 ATG13 基因 N 端通过插入 TagBFP-T2A-TwinStrep 标签蛋白, 该内源基因在不同的细胞株中的表达本底值不同, 可能会存在在该基因低表达细胞株中检测不到标签蛋白表达的风险。
- 6) 该方案是针对 ATG13 (NM_001346311.2) 转录本进行设计, 该基因存在多个转录本, 存在不能标记所有转录本的风险。

方案三

〈项目方案〉

归口部门：市场部

文件类别：资料文件

文档编号〈 PG-MD-INF-063-2021-1.0 〉

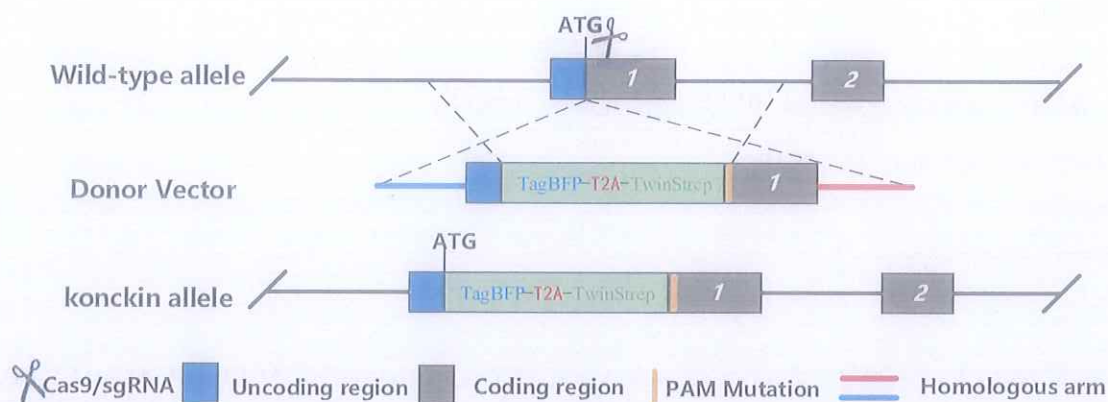
控制状态：非受控文件

编制人：曾洋

日期：20211025

项目方案	
项目目的	
利用 CRISPR/Cas9 同源重组技术构建在 ATG101 基因 N 端定点敲入 TagBFP-T2A-TwinStrep 表达元件的 Jurkat 76 细胞株。	
基因信息	
基因名称: ATG101 autophagy related 101 [Homo sapiens (human)]	
NCBI ID:60673, updated on 17-Oct-2021	
别名: C12orf44	
NM 号: NM_021934.5	
插入表达元件: TagBFP-T2A-TwinStrep 标签	
元件序列:	
<pre> ATGAGCGAGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGTACATGGAGGGCACCGTGGACAACCATCA CTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAGACCATGAGAATCAAGGTGG TCGAGGGCGGCCCTCTCCCTTCGCCTTCGACATCCTGGCTACTAGCTTCCTCTACGGCAGCAAGACCTT CATCAACCACACCCAGGGCATCCCCGACTTCTTCAAGCAGTCCTCCCTGAGGGCTTCACATGGGAGAG AGTCACCACATACGAAGACGGGGCGTGCTGACCGCTACCCAGGACACCAGCCTCCAGGACGGGTGCT CATCTACAACGTCAAGATCAGAGGGGTGAACTTCACATCCAACGGCCCTGTGATGCAGAAGAAAACACT CGGCTGGGAGGCCTTACCGAGACGCTGTACCCCGCTGACGGCGGCCTGGAAGGCAGAAACGACATGG CCCTGAAGCTCGTGGGCGGGAGCCATCTGATCGCAAACGCCAAGACCACATATAGATCCAAGAAACCCG CTAAGAACCTCAAGATGCCTGGCGTCTACTATGTGGACTACAGACTGGAAAGAATCAAGGAGGCCAACA ACGAGACCTACGTCGAGCAGCACGAGGTGGCAGTGGCCAGATACTGCGACCTCCCTAGCAAACCTGGGGC ACAAGCTTAATGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTGAGGAGAATCCTGGCCCAAGCTA GCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAGAAAGGTGGAGGTGCCCCGAGGTGGATCGGGAGGTGGATCGTGGAGC CACCCGCAGTTCGAAAAAGGATTTCGATTACAAGGATGACAAGGGTACC </pre>	
备注: 根据客户需求, 在 ATG101 (NM_021934.5) 转录本的 N 端起始密码子处插入 TagBFP-T2A-TwinStrep 元件, 插入元件长度为 873bp, TagBFP-T2A-TwinStrep 在内源 ATG101 基因的调控下表达。	
细胞信息	
细胞名称: Jurkat 76; 人 T 淋巴细胞	
ATCC 编号: /	
生长方式: 悬浮	
完全培养基配方: RPMI-1640+10%FBS (待客户确认)	
培养条件 (默认): 37°C, 5% CO2	
细胞来源: 客户提供	
技术原理	
<p>本项目采用 CRISPR/Cas9 技术对内源 ATG101 基因进行修饰。针对目的基因的插入位点, 设计对应的 sgRNA, 体外转录 sgRNA, 筛选有效的 sgRNA, 并构建含有对应同源臂的 Donor 质粒作为修复模板, 利用设计的特异性 sgRNA, 指导 Cas9 对目的位点进行切割, 引起 DNA 双链断裂, 通过同源重组的方式将 TagBFP-T2A-TwinStrep 插入指定位点, 通过 TagBFP 标签筛选出阳性单克隆细胞, 对筛选出的单克隆细胞进行 PCR 及测序鉴定, 确定目的修饰位点序列正确。</p>	

方案策略示意图：



项目流程

第一步：目的细胞检测

对目的细胞进行基因型、支原体、转染效率、单克隆形成效率以及 STR 鉴定等检测。

第二步：sgRNA 设计与筛选

在 ATG101 (NM_021934.5) 转录本的 N 端位点附近设计 sgRNA，筛选出切割效率高的 sgRNA。

第三步：构建 Cas9-sgRNA 共表达质粒和 Donor 质粒

将筛选出的 sgRNA 与 Cas9 构建共表达质粒，携带 mCherry 筛选标记；根据筛选出来的 sgRNA，进行 Donor 载体的构建，在 TagBFP-T2A-TwinStrep 表达元件两端加 600~800bp 左右的同源臂。

第四步：目的细胞转染与筛选

将 Cas9/sgRNA 和 Donor 质粒转染目的细胞，通过流式分选筛选出阳性单克隆细胞，并进行扩增。

第五步：基因型鉴定

对筛选出的单克隆细胞进行 PCR 及测序鉴定，确定目的修饰位点序列正确。

第六步：产物与报告交付

将构建成功的目的细胞进行扩增，并进行支原体检测等质量控制，冻存并寄送细胞，同时撰写报告一并交付。

项目周期

预实验阶段	时间(周)	项目内容
单克隆形成	2-4	检测细胞单克隆形成能力
转染效率	1-2	检测细胞转染效率
支原体检测	1-2	检测细胞是否存在支原体污染
细胞基因型检测	1-2	测序检测细胞突变位点基因型
细胞 STR 鉴定	2	检测细胞是否存在交叉污染
细胞活性检测	1-2	利用台盼蓝染色法检测细胞活性
合计	3-4 周	
正式实验阶段	时间(周)	项目内容
载体设计、构建及验证	3-4	设计并构建 sgRNA 质粒、转染细胞并对 sgRNA 切割

		效率进行验证, 构建 Donor 质粒
目的细胞转染与单克隆筛选	6-8	转染目的细胞、通过筛选标记进行阳性单克隆细胞筛选并进行细胞扩增
细胞鉴定与扩增	2-4	单克隆细胞 PCR 及测序鉴定, 并进一步扩增
质量控制	1-2	质量控制、交付准备
合计:	12-18	
注意事项		
<p>1) 方案周期是以 2-3 天传代 1 次的细胞系为参考计算, 若增殖较慢的细胞系, 需增加周期。</p> <p>2) 经预实验确认细胞有单克隆形成能力、瞬转效率符合标准、基因型正确、无支原体污染、无细胞系污染的前提下, 可按现有方案进行正式实验。如预实验情况不符合预期, 则甲乙双方可协商更改方案。</p> <p>3) 采用 CRISPR/Cas9 技术切割 DNA, 构建后细胞株需将 sgRNA 识别位点的 PAM 序列进行同义突变, 以阻止 Cas9 对 Donor 载体中序列产生切割。若 PAM 不能进行同义突变, 选择同义突变靠近 PAM 10bp 之内的碱基。</p> <p>4) 该方案通过在 ATG101 基因 N 端通过插入 TagBFP-T2A-TwinStrep 标签蛋白, 该内源基因在不同的细胞株中的表达本底值不同, 可能会存在在该基因低表达细胞株中检测不到标签蛋白表达的风险。</p>		

方案四

〈项目方案〉

归口部门：市场部

文件类别：资料文件

文档编号〈 PG-MD-INF-064-2021-1.0 〉

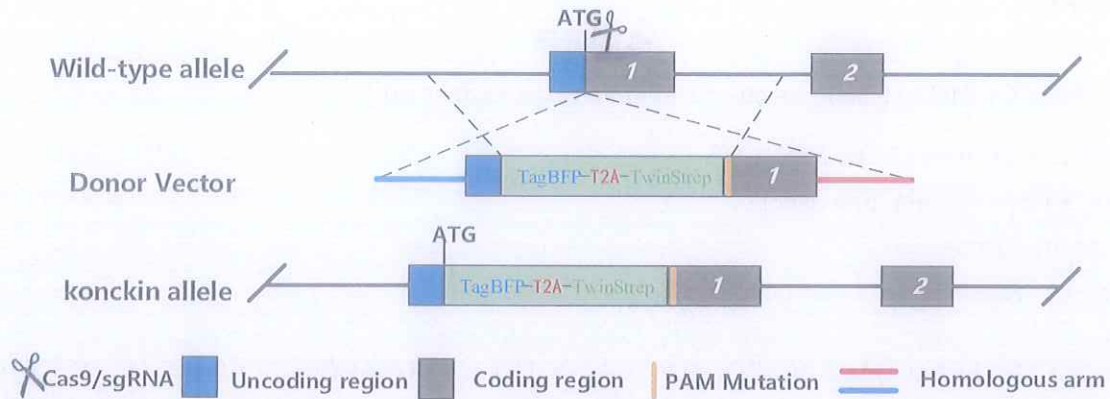
控制状态：非受控文件

编制人：曾洋

日期：20211025

项目方案	
项目目的	
利用 CRISPR/Cas9 同源重组技术构建在 RB1CC1 基因 N 端定点敲入 TagBFP-T2A-TwinStrep 表达元件的 Jurkat 76 细胞株。	
基因信息	
基因名称: RB1CC1 RB1 inducible coiled-coil 1 [Homo sapiens (human)]	
NCBI ID:9821, updated on 17-Oct-2021	
别名: CCI; ATG17; FIP200; PPP1R131	
NM 号: NM_014781.5	
插入表达元件: TagBFP-T2A-TwinStrep 标签	
元件序列: <pre> ATGAGCGAGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGTACATGGAGGGCACCGTGGACAACCATCA CTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAGACCATGAGAATCAAGGTGG TCGAGGGCGGCCCTCTCCCTTCGCCTTCGACATCCTGGCTACTAGCTTCCTCTACGGCAGCAAGACCTT CATCAACCACACCCAGGGCATCCCCGACTTCTTCAAGCAGTCCTTCCCTGAGGGCTTCACATGGGAGAG AGTCACCACATACGAAGACGGGGGCGTGCTGACCGCTACCCAGGACACCAGCCTCCAGGACGGGTGCC CATCTACAACGTCAAGATCAGAGGGGTGAACTTCACATCCAACGGCCCTGTGATGCAGAAGAAAACACT CGGCTGGGAGGCCTTCACCGAGACGCTGTACCCCGCTGACGGCGGCCTGGAAGGCAGAAACGACATGG CCCTGAAGCTCGTGGGCGGGAGCCATCTGATCGCAAACGCCAAGACCACATATAGATCCAAGAAACCCG CTAAGAACCTCAAGATGCCTGGCGTCTACTATGTGGACTACAGACTGGAAAGAATCAAGGAGGCCAACA ACGAGACCTACGTCGAGCAGCACGAGGTGGCAGTGGCCAGATACTGCGACCTCCCTAGCAAACCTGGGGC ACAAGCTTAATGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGCCCAAGCTA GCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAGAAAAGGTGGAGGTGCCCCGAGGTGGATCGGGAGGTGGATCGTGGAGC CACCCGCAGTTCGAAAAAGGATTCGATTACAAGGATGACAAGGGTACC </pre>	
备注:根据客户需求,在 RB1CC1(NM_014781.5)转录本的 N 端起始密码子处插入 TagBFP-T2A-TwinStrep 元件,插入元件长度为 873bp,TagBFP-T2A-TwinStrep 在内源 RB1CC1 基因的调控下表达。	
细胞信息	
细胞名称: Jurkat 76; 人 T 淋巴细胞	
ATCC 编号: /	
生长方式: 悬浮	
完全培养基配方: RPMI-1640+10%FBS (待客户确认)	
培养条件(默认): 37°C, 5% CO2	
细胞来源: 客户提供	
技术原理	
本项目采用 CRISPR/Cas9 技术对内源 RB1CC1 基因进行修饰。针对目的基因的插入位点,设计对应的 sgRNA,体外转录 sgRNA,筛选有效的 sgRNA,并构建含有对应同源臂的 Donor 质粒作为修复模板,利用设计的特异性 sgRNA,指导 Cas9 对目的位点进行切割,引起 DNA 双链断裂,通过同源重组的方式将 TagBFP-T2A-TwinStrep 插入指定位点,通过 TagBFP 标签筛选出阳性单克隆细胞,对筛选出的单克隆细胞进行 PCR 及测序鉴定,确定目的修饰位点序列正确。	

方案策略示意图：



项目流程

第一步：目的细胞检测

对目的细胞进行基因型、支原体、转染效率、单克隆形成效率以及 STR 鉴定等检测。

第二步：sgRNA 设计与筛选

在 RB1CC1 (NM_014781.5) 转录本的 N 端位点附近设计 sgRNA，筛选出切割效率高的 sgRNA。

第三步：构建 Cas9-sgRNA 共表达质粒和 Donor 质粒

将筛选出的 sgRNA 与 Cas9 构建共表达质粒，携带 mCherry 筛选标记；根据筛选出来的 sgRNA，进行 Donor 载体的构建，在 TagBFP-T2A-TwinStrep 表达元件两端加 600~800bp 左右的同源臂。

第四步：目的细胞转染与筛选

将 Cas9/sgRNA 和 Donor 质粒转染目的细胞，通过流式分选筛选出阳性单克隆细胞，并进行扩增。

第五步：基因型鉴定

对筛选出的单克隆细胞进行 PCR 及测序鉴定，确定目的修饰位点序列正确。

第六步：产物与报告交付

将构建成功的目的细胞进行扩增，并进行支原体检测等质量控制，冻存并寄送细胞，同时撰写报告一并交付。

项目周期

预实验阶段	时间(周)	项目内容
单克隆形成	2-4	检测细胞单克隆形成能力
转染效率	1-2	检测细胞转染效率
支原体检测	1-2	检测细胞是否存在支原体污染
细胞基因型检测	1-2	测序检测细胞突变位点基因型
细胞 STR 鉴定	2	检测细胞是否存在交叉污染
细胞活性检测	1-2	利用台盼蓝染色法检测细胞活性
合计	3-4 周	
正式实验阶段	时间(周)	项目内容
载体设计、构建及验证	3-4	设计并构建 sgRNA 质粒、转染细胞并对 sgRNA 切割

		效率进行验证, 构建 Donor 质粒
目的细胞转染与单克隆筛选	6-8	转染目的细胞、通过筛选标记进行阳性单克隆细胞筛选并进行细胞扩增
细胞鉴定与扩增	2-4	单克隆细胞 PCR 及测序鉴定, 并进一步扩增
质量控制	1-2	质量控制、交付准备
合计:	12-18	

注意事项

- 1) 方案周期是以 2-3 天传代 1 次的细胞系为参考计算, 若增殖较慢的细胞系, 需增加周期。
- 2) 经预实验确认细胞有单克隆形成能力、瞬转效率符合标准、基因型正确、无支原体污染、无细胞系污染的前提下, 可按现有方案进行正式实验。如预实验情况不符合预期, 则甲乙双方可协商更改方案。
- 3) 初步预测符合的 sgRNA 数量有限 (2 条), 存在筛选不到可用 sgRNA 的风险。
- 4) 采用 CRISPR/Cas9 技术切割 DNA, 构建后细胞株需将 sgRNA 识别位点的 PAM 序列进行同义突变, 以阻止 Cas9 对 Donor 载体中序列产生切割。若 PAM 不能进行同义突变, 选择同义突变靠近 PAM 10bp 之内的碱基。
- 5) 该方案通过在 RB1CC1 基因 N 端通过插入 TagBFP-T2A-TwinStrep 标签蛋白, 该内源基因在不同的细胞株中的表达本底值不同, 可能会存在在该基因低表达细胞株中检测不到标签蛋白表达的风险。

方案五

〈项目方案〉

归口部门：市场部

文件类别：资料文件

文档编号〈 PG-MD-INF-065-2021-1.0 〉

控制状态：非受控文件

编制人：曾洋

日期：20211025

项目方案

项目目的

利用 CRISPR/Cas9 同源重组技术构建在 CD247 基因 C 端定点敲入 TwinStrep-T2A-TagBFP 表达元件的 Jurkat 76 细胞株。

基因信息

基因名称: CD247 CD247 molecule [Homo sapiens (human)]

NCBI ID:919, updated on 19-Sep-2021

别名: T3Z; CD3H; CD3Q; CD3Z; TCRZ; IMD25; CD3-ZETA

NM 号: NM_198053.3

插入表达元件: TwinStrep-T2A-TagBFP 标签

元件序列:

```
GCTAGCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAGAAAGGTGGAGGTGCCCGAGGTGGATCGGGAGGTGGATC
GTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAAGGAGGTACCGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGA
CGTCGAGGAGAATCCTGGCCCAAGCGAGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGTACATGGAGG
GCACCGTGGACAACCATCACTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAG
ACCATGAGAATCAAGGTGGTTCGAGGGCGGCCCTCTCCCTTCGCCTTCGACATCCTGGCTACTAGCTTCC
TCTACGGCAGCAAGACCTTCATCAACCACACCCAGGGCATCCCCGACTTCTTCAAGCAGTCCTTCCCTGA
GGGCTTCACATGGGAGAGAGTCAACACATACGAAGACGGGGGCGTGTGACCGCTACCCAGGACACCA
GCCTCCAGGACGGCTGCCTCATCTACAACGTCAAGATCAGAGGGGTGAACTTACATCCAACGGCCCTG
TGATGCAGAAGAAAACACTCGGCTGGGAGGCCTTACCGAGACGCTGTACCCCGCTGACGGCGGCCTGG
AAGGCAGAAACGACATGGCCCTGAAGCTCGTGGGCGGGAGCCATCTGATCGCAAACGCCAAGACCACA
TATAGATCCAAGAAACCCGCTAAGAACCTCAAGATGCCTGGCGTCTACTATGTGGACTACAGACTGGAA
AGAATCAAGGAGGCCAACACGAGACCTACGTCGAGCAGCACGAGGTGGCAGTGGCCAGATACTGCGA
CCTCCCTAGCAAACCTGGGGCACAAAGCTTAATTA
```

备注: 根据客户需求, 在 CD247 (NM_198053.3) 转录本的 N 端起始密码子处插入 TwinStrep-T2A-TagBFP 元件, 插入元件长度为 873bp, TagBFP-T2A-TwinStrep 在内源 CD247 基因的调控下表达。

细胞信息

细胞名称: Jurkat 76; 人 T 淋巴细胞

ATCC 编号: /

生长方式: 悬浮

完全培养基配方: RPMI-1640+10%FBS (待客户确认)

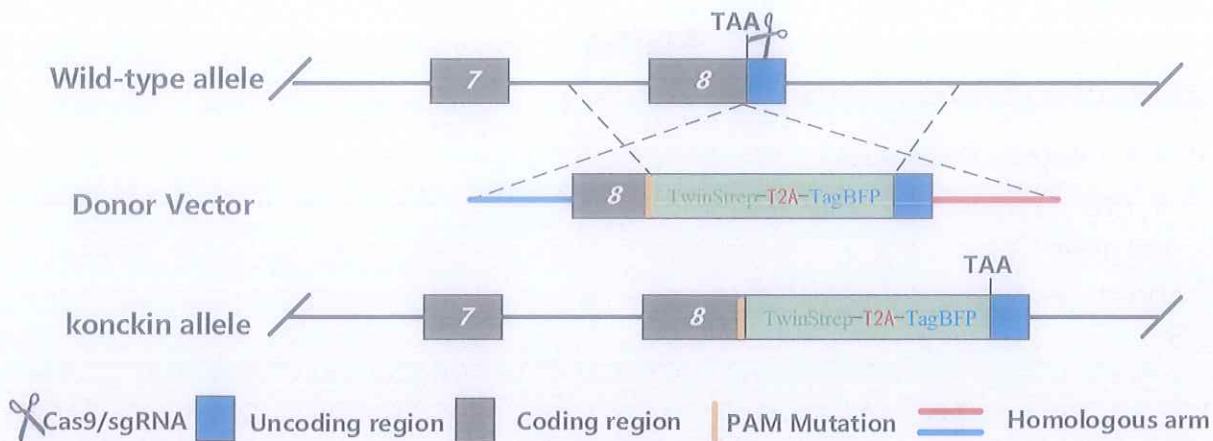
培养条件 (默认): 37°C, 5% CO₂

细胞来源: 客户提供

技术原理

本项目采用 CRISPR/Cas9 技术对内源 CD247 基因进行修饰。针对目的基因的插入位点, 设计对应的 sgRNA, 体外转录 sgRNA, 筛选有效的 sgRNA, 并构建含有对应同源臂的 Donor 质粒作为修复模板, 利用设计的特异性 sgRNA, 指导 Cas9 对目的位点进行切割, 引起 DNA 双链断裂, 通过同源重组的方式将 TwinStrep-T2A-TagBFP 插入指定位点, 通过 TagBFP 标签筛选出阳性单克隆细胞, 对筛选出的单克隆细胞进行 PCR 及测序鉴定, 确定目的修饰位点序列正确。

方案策略示意图:



项目流程

第一步: 目的细胞检测

对目的细胞进行基因型、支原体、转染效率、单克隆形成效率以及 STR 鉴定等检测。

第二步: sgRNA 设计与筛选

在 CD247 (NM_198053.3) 转录本的 C 端位点附近设计 sgRNA, 筛选出切割效率高的 sgRNA。

第三步: 构建 Cas9-sgRNA 共表达质粒和 Donor 质粒

将筛选出的 sgRNA 与 Cas9 构建共表达质粒, 携带 mCherry 筛选标记; 根据筛选出来的 sgRNA, 进行 Donor 载体的构建, 在 TwinStrep-T2A-TagBFP 表达元件两端加 600~800bp 左右的同源臂。

第四步: 目的细胞转染与筛选

将 Cas9/sgRNA 和 Donor 质粒转染目的细胞, 通过流式分选筛选出阳性单克隆细胞, 并进行扩增。

第五步: 基因型鉴定

对筛选出的单克隆细胞进行 PCR 及测序鉴定, 确定目的修饰位点序列正确。

第六步: 产物与报告交付

将构建成功的目的细胞进行扩增, 并进行支原体检测等质量控制, 冻存并寄送细胞, 同时撰写报告一并交付。

项目周期

预实验阶段	时间(周)	项目内容
单克隆形成	2-4	检测细胞单克隆形成能力
转染效率	1-2	检测细胞转染效率
支原体检测	1-2	检测细胞是否存在支原体污染
细胞基因型检测	1-2	测序检测细胞突变位点基因型
细胞 STR 鉴定	2	检测细胞是否存在交叉污染
细胞活性检测	1-2	利用台盼蓝染色法检测细胞活性
合计	3-4 周	
正式实验阶段	时间(周)	项目内容

载体设计、构建及验证	3-4	设计并构建 sgRNA 质粒、转染细胞并对 sgRNA 切割效率进行验证，构建 Donor 质粒
目的细胞转染与单克隆筛选	6-8	转染目的细胞、通过筛选标记进行阳性单克隆细胞筛选并进行细胞扩增
细胞鉴定与扩增	2-4	单克隆细胞 PCR 及测序鉴定，并进一步扩增
质量控制	1-2	质量控制、交付准备
合计：	12-18	
注意事项		
<p>1) 方案周期是以 2-3 天传代 1 次的细胞系为参考计算，若增殖较慢的细胞系，需增加周期。</p> <p>2) 经预实验确认细胞有单克隆形成能力、瞬转效率符合标准、基因型正确、无支原体污染、无细胞系污染的前提下，可按现有方案进行正式实验。如预实验情况不符合预期，则甲乙双方可协商更改方案。</p> <p>3) 采用 CRISPR/Cas9 技术切割 DNA，构建后细胞株需将 sgRNA 识别位点的 PAM 序列进行同义突变，以阻止 Cas9 对 Donor 载体中序列产生切割。若 PAM 不能进行同义突变，选择同义突变靠近 PAM 10bp 之内的碱基。</p> <p>4) 该方案通过在 CD247 基因 C 端通过插入 TwinStrep-T2A-TagBFP 标签蛋白，该内源基因在不同的细胞株中的表达本底值不同，可能会存在在该基因低表达细胞株中检测不到标签蛋白表达的风险。</p>		



