HEL-CAS9 细胞使用说明书

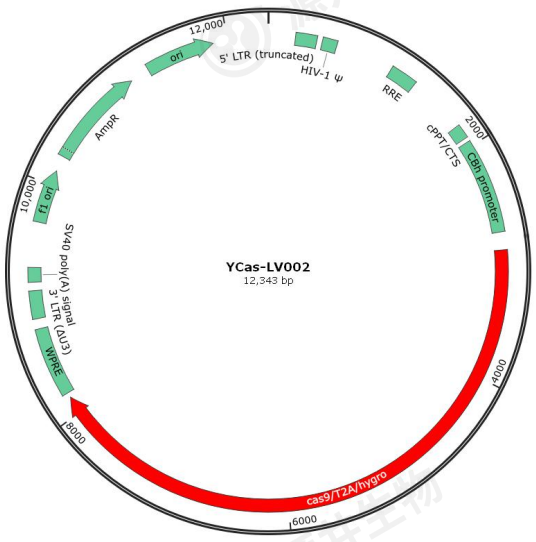
产品基本信息

产品货号	YC-C090-Cas9-H		
细胞名称	HEL-CAS9	细胞形态	淋巴母细胞样, 悬浮生长
荧光抗性	无荧光，Hygro	传代比例	1：2-1：4
培养体系	90%RPMI-1640+10% FBS 源井细胞培养未加双抗，客户可视实际情况选择添加		
冻存液体系	50%RPMI-1640+40% FBS+10%DMSO		
半药浓度	H=50.0μg/mL 注意：为了维持 Cas9 基因表达量的稳定，细胞状态良好时加药培养。		
特殊备注			

注意：如收到为活细胞，原瓶罐装培养基仅含 5%血清，需额外补充血清或更换新的完全培养基进行培养。

产品验证数据

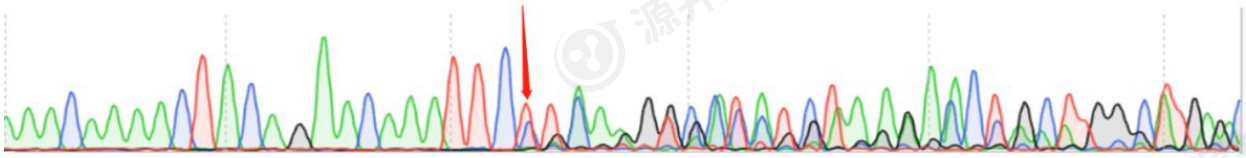
（1）质粒图谱



2) RT-QPCR

Sample Name	Target Name	Cт Mean	ΔCт
HEL-CAS9	Cas9	22.78391838	5.62546348
HEL-CAS9	β-actin	17.15845490	
HEL	Cas9	34.84961700	16.51712989
HEL	β-actin	18.33248711	

3) 切割验证



注：上图为在 HEL-CAS9 稳转细胞株上，电转靶向 ADHB 基因的 gRNA 质粒，药筛 48h 后取 pool 细胞检测的测序峰图。红色箭头标示处为套峰出现的位置，显示靶位点由于发生了切割而导致基因型明显改变，说明 Cas9 核酸酶成功表达。

Cas9 稳转细胞株的使用

1) 该细胞株已稳定表达 Cas9 核酸酶，仅需转染 gRNA，即可实现基因敲除，而转染 gRNA 和供体 DNA，则可实现基因敲入/点突变。

2) 转染的 gRNA 可以是质粒也可以是合成的或体外转录的 sgRNA，转染方法可以选择瞬转（如：脂质体法、电转法），也可以选择稳转（如：慢病毒法）。

3) 细胞系在体外长期培养可能导致部分细胞基因组发生改变，不排除部分改变会降低 Cas9 的表达。因此，建议使用低代次（10 代以内）的细胞进行实验，效果更佳。

细胞接收

1) 冻存细胞：如果是干冰运输的冻存细胞，收到后请立即转入液氮储存或短暂（24H)放至-80℃冰箱保存，或直接进行细胞复苏。

2) 活细胞：如果是 T25 瓶活细胞运输，收到后用 75%的酒精对 T25 瓶外表面进行消毒，之后放在 5%CO2、37℃的细胞培养箱静置 2h，静置后取出细胞瓶在显微镜下观察细胞贴壁情况和细胞汇合度，分别在 100X 和 40X 下各拍 2 个不同视野的细胞拍照记录。首次处理时将培养基转移至 2 个 50mL 离心管，1100rmp，离心 4min，弃上清，用 2mL 完全培养基重悬细胞，取 20μL 细胞进行细胞计数并检测细胞活率，根据细胞计数将细胞密度调整为 $2x10^5$~$4.0x10^5$ 个细胞/mL；视细胞密度将细胞重悬在不同规格的培养瓶中。具体参考表 1。(灌满细胞培养基不能正常用来培养细胞。)

注意：收到细胞后，活细胞首先观察细胞瓶是否完好，培养液是否漏液、浑浊等现象。冻存细胞若发现干冰已挥发完、冻存管瓶盖脱落、破损等异常情况，请务必**拍照保留**，并于收货 24h 内与我们联系（电话：400-688-9033；https://www.ubigene.com）。

细胞复苏

1) 准备工作：将完全培养液置 37℃水浴锅预热 30 分钟，随后将冻存的细胞从液氮中取出，转移到-80℃冰箱，放置数分钟让残余液氮挥发；

2) 在超净台内用吸管吸取 6-7 mL 完全培养液至 15 mL 离心管中；

3) 将细胞从-80℃冰箱取出暂时放置于干冰里，复苏时稍稍甩动，去除残留的干冰和液氮，再迅速用镊子夹住盖子放入 37℃水浴中快速晃动（注意：水不能没过盖子），使其在 1 分钟左右完全融化；

4) 在超净台内，用酒精棉球擦拭冻存管外壁消毒，稍稍晾干。用单道移液器将所有融化的细胞悬液转至提前准备好的完全培养液中，盖上盖子，1100 rpm 室温离心 4 分钟收集细胞；

5) 超净台内小心吸弃上清，用单道移液器吸取 1 mL 新鲜完全培养液重悬细胞至单细胞悬液，再转移至装有 4 mL 完全培养液的 T25 cm^2 培养瓶（或者 6cm 的皿) 中，写上细胞名称、复苏日期、代次，放置 37℃、5% CO2 饱和湿度培养箱内培养。

注意：请勿直接复苏到 T75 cm^2 瓶或 10cm 的皿。

细胞传代

待细胞长至规定的密度即可传代，悬浮细胞的传代可分为以下两种情况：

A. 半换液：细胞状态良好，细胞碎片较少，培养基没有变黄情况下使用半换液传代；

1) 在超净台内把培养瓶内细胞吹打均匀，取 20μL 细胞进行细胞计数；

2) 根据计数结果，吸弃部分细胞悬液，将细胞密度调整为 $2x10^5$~$4.0x10^5$ 个细胞/mL 内培养，视细胞培养密度将细胞培养在不同规格的培养瓶中。

B. 全换液：当细胞状态良好，细胞碎片较多，培养基变黄的情况下，使用全换液；

1) 在超净台内将培养液转至 15mL 离心管或 50mL 离心管中，1100rpm 离心 4 分钟；

2) 弃上清，用单道移液器吸取 1mL 完全培养基重悬细胞沉淀，20μL 细胞悬液进行细胞计数；

3) 根据细胞计数结果，将细胞密度调整为 $2x10^5$~$4.0x10^5$ 个细胞/mL 内培养，视细胞培养体积将细胞培养在不同规格的培养瓶中。置于 5%CO2、37℃的细胞培养箱培养即可。

表 1　悬浮细胞不同体积培养基对应不同培养瓶列表

培养物规格	培养基体积
6 孔板	3 mL
T25	5mL-8mL
T75	12mL-28mL
T175	30mL-50mL

细胞冻存

1) 按细胞传代的方法，在超净台内把培养瓶里的细胞转移到 50mL 离心管，1100 rpm 室温离心 4 分钟；

2) 离心后，打开盖子倒去上清，用 1~2 mL 4℃预冷的冻存液重悬细胞，用移液管吹打混合均匀，

取 20 μL 进行细胞计数，随后加入冻存液调整至密度为 5×10^6-$1x10^7$ 个细胞/mL。

3) 将细胞悬液按 1 mL/管平均分装至冻存管中，旋紧盖子，冻存管应提前贴好细胞名称、来源、细胞代次、数量、冻存日期；

4) 将冻存管放置于 4℃预冷的程序降温盒中，并在冻存结束的 15 分钟之内将程序降温盒放置超低温冰箱内；

5) 过夜后，将冻存细胞转移至液氮罐内保存。