

IPEC-J2-CAS9 细胞使用说明书

产品基本信息

产品货号	YC-C072-Cas9-H		
细胞名称	IPEC-J2-CAS9	细胞形态	上皮样, 贴壁细胞
荧光抗性	无荧光, Hygro	传代比例	1:2~1:3
培养体系	90%DMEM+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%DMEM+40% FBS+10%DMSO	半药浓度	H=250.0 µg/ml
特殊备注			

产品验证数据

1) RT-QPCR

Sample Name	Target Name	Ct Mean	ΔCt
IPEC-J2-CAS9	Cas9	23.84248352	5.55698013
IPEC-J2-CAS9	β-actin	18.28550339	
IPEC-J2	Cas9	31.63539696	13.75501633
IPEC-J2	β-actin	17.88038063	

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°C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°C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。如果汇合度达到 80%以上的传代密度，可以进行传代操作，如果细胞汇合度没有达 80%以上不够传代，弃掉瓶内培养基，更换新鲜完全培养基。（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°C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°C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°C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°C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 cm² 培养瓶 (或者 6cm 的皿) 中，写上细胞名称、复苏日期、代次，放置 37°C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养。

注意：请勿直接复苏到 T75 cm² 瓶或 10cm 的皿。

细胞传代

- 1) 常规细胞长至 80%-90% 汇合度即可传代。在超净台内把培养瓶里的培养液倒至废液缸，用 1× PBS (T25 cm² 培养瓶添加约 2~3mL, T75 cm² 培养瓶约 4~5 mL) 洗涤细胞 1~2 次，以去除残余的培养液和血清 (血清含有胰酶的抑制因子)；
- 2) 加入相应体积的胰酶溶液，具体参考附表 1，轻轻晃动瓶子并使胰酶完全浸过细胞，将培养瓶放入培养箱孵育 1~2 分钟 (若细胞难以消化，可适当延长孵育时间)，待在显微镜下观察到大部分细胞变圆不贴壁，轻轻晃动和敲击培养瓶两侧有大量细胞脱离时，立即终止消化；
- 3) 加入 2 倍胰酶体积的完全培养液终止消化，并轻吹打细胞数次，使所有细胞彻底脱壁； (注意：吹散细胞时注意要轻柔，尽量不产生气泡或尽可能产生少量气泡。)；
- 4) 用 10 mL 移液管转移细胞悬液到一支 50 mL 离心管中，同一批次的细胞可以合并收集在一起，视情况用适量 PBS 将培养瓶里的残余细胞洗下来，一起加到 50mL 离心管中。盖上盖子，做好标记；
- 5) 1100 rpm 室温离心 4 分钟，离心后，打开盖子弃上清，加 2mL 完全培养基重悬细胞；
- 6) 细胞按照一定的接种比例传代，首次按照 1: 3 进行传代，若细胞在两天内长满可增加传代比例，若细胞生长三四天还未长满，可适当缩小传代比例。

表 1 不同规格培养物加入胰酶体积列表

培养物规格	胰酶体积
-------	------



6孔板	0.5 mL
T25	1 mL
T75	2-3 mL
T175	3-4 mL

注意：为了维持 Cas9 基因表达量的稳定，建议传代时半药培养。

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进行消化至单细胞悬液，加入培养基终止反应。所有液体转移到一支 50 mL 离心管中。
- 2) 用移液管吹打混合均匀，取 20 μ L 进行细胞计数；
- 3) 1100 rpm 室温离心 4 分钟，离心后，打开盖子倒去上清，用 1~2 mL 4°C 预冷的冻存液重悬细胞，随后加入冻存液调整至密度为 1×10^6 - 1×10^7 个细胞/mL。
- 4) 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、细胞代次、数量、冻存日期；
- 5) 将冻存管放置于 4°C 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；
- 6) 过夜后，将冻存细胞转移至液氮罐内保存。

