RAW 264.7-CAS9 细胞使用说明书

产品基本信息

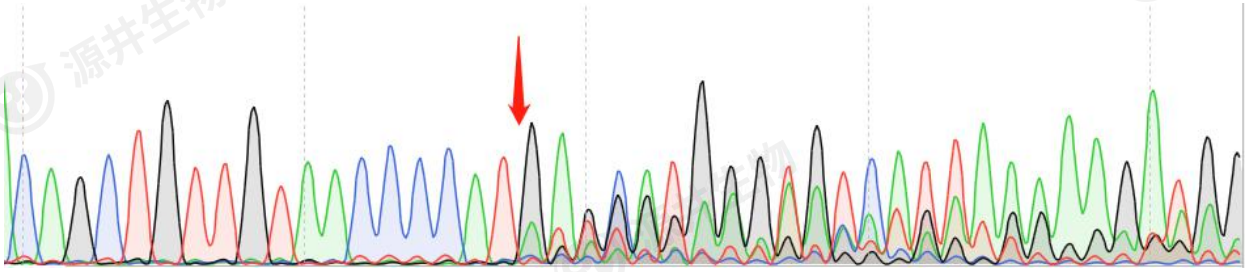
产品货号	YC-C020-Cas9-H		
细胞名称	RAW 264.7-CAS9	细胞形态	单核细胞样, 贴壁细胞
荧光抗性	无荧光，Hygro	传代比例	1:2-1:3
培养体系	90%DMEM+10%FBS 源井细胞培养未加双抗，客户可视实际情况选择添加		
冻存液体系	50%DMEM+40% FBS+10%DMSO	半药浓度	H=350.0μg/ml
特殊备注	不能用胰酶消化，要用单道移液器轻柔将细胞吹成单个细胞。		

产品验证数据

1) RT-QPCR

Sample Name	Target Name	Cт Mean	ΔCт
RAW 264.7-CAS9	Cas9	20.70931435	8.58496571
RAW 264.7-CAS9	β-actin	12.12434864	
RAW 264.7	Cas9	34.13895035	21.32848454
RAW 264.7	β-actin	12.81046581	

2) 切割验证



注：上图为在 RAW 264.7-CAS9 稳转细胞株上，电转靶向 Ppt1 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。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℃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

1) 该细胞要每天都传代，传代时在超净台内用单道移液器将细胞轻柔吹成单个细胞（一定要在显微镜下看到细胞全部吹散）。

2) 将细胞悬液转移到一支 15mL 离心管或者 50 mL 离心管中，同一批次的细胞可以合并收集在一起，盖上盖子，做好标记；

3) 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；

4) 细胞按照一定的接种比例传代，首次按照 1：2 进行传代。

注意：为了维持 Cas9 基因表达量的稳定，活率大于 70%时建议半药培养。

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吹散至单细胞悬液。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 μL 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℃预冷的冻存液重悬细胞，随后加入冻存液调整至密度为 $1x10^6$-$1x10^7$ 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℃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。