

293T-Cas9Nick 细胞说明书

货号: C1204

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% CO₂

细胞简介:

293T-Cas9Nick 细胞是用 HEK293T 细胞构建的稳定表达 Cas9 蛋白的细胞株。在转入 gRNA 表达质粒或者化学合成的 gRNA 后可以对细胞基因组 DNA 进行定点切割。也可以配合验证载体 pTYNE 载体实现对基因敲除靶点的筛选和验证。

细胞系构建方法简介:

- 1、Cas9Nicknase 蛋白慢病毒表达载体 pLV-Cas9Nick-Puro 包装为慢病毒。
- 2、用 Cas9Nicknase 表达慢病毒感染 HEK293T 细胞。
- 3、嘌呤霉素筛选出稳定细胞株。

使用注意事项:

- 1、293T-Cas9Nick 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, 因此后续实验进行细胞筛选时, 不宜采用这两者抗生素进行。
- 2、Cas9Nickase 蛋白需要 gRNA 配合才能对细胞的基因组进行定点切割。单独使用不能发挥基因敲除或者编辑作用。配套的 gRNA 表达载体有 pGR 系列载体和 pGR-EGFP 系列载体。293T-Cas9 细胞推荐用 pGR-Hygro (货号 CR2013) 和 pGR-EGFP-Hygro (货号 CR2016)。
- 3、Cas9Nickase 蛋白对 DNA 进行单链切割。因此需要一对 gRNA 才能实现 DNA 双链断裂。
- 4、仅采用 gRNA 表达载体对目标基因切割, 细胞一般通过 NHEJ (非同源重组末端连接, nonhomologous end-joining) 进行修复, 常导致缺失突变。转入 gRNA 表达载体的同时转入同源重组的模板, 可以通过同源重组实现基因突变或敲除。具体同源重组的设计和构建以及阳性细胞克隆筛选的方法请参照相关文献。

细胞培养注意事项:

- 1、293T-Cas9Nick 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-Cas9Nick 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%CO₂ 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 1×10^6 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。