MDA-T41-Cas9 细胞说明书

▶ 产品基本信息

Cas9 蛋白是 CRISPR 基因编辑系统的核心功能元件，其独特的分子机制和高效的 DNA 切割能力使其成为现代基因编辑技术的基石。Cas9 稳转细胞株是一种可以实验 Cas9 蛋白持续稳定表达的细胞模型，其细胞活性和状态稳定，为基因编辑研究提供了高效工具。艾迪基因通过创新性整合 OE-Booste 顺式调控元件，成功构建了新一代 Cas9 稳转株，呈现显著的 Cas9 表达水平和基因编辑效率，助力于基因功能研究、高通量筛选、疾病模型构建及细胞治疗开发等。

产品货号	EDC01196
产品名称	MDA-T41-Cas9
生长特性	贴壁生长
消化时间	~1 min
荧光、抗性	无荧光，BSD
半药浓度	blast=20 μg/mL
传代比例	1:3
完全培养基	1640+10% FBS+1% GlutaMAX+1% NEAA
冻存培养基	70% 完全培养基+20% FBS+10% DMSO

► Cas9 细胞株产品特点：

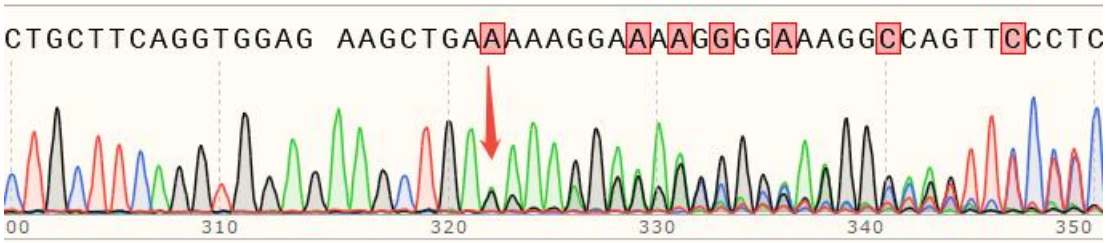
优异稳定性：搭载 OE-Booster 调控元件，优化 mRNA 的稳定性，确保 Cas9 蛋白持续稳定表达。

实验简便性：稳转株持续表达 Cas9 蛋白，无需单独转染 Cas9 基因，简化流程。

广泛适用性：适用于基因功能研究、文库筛选、疾病模型构建及细胞治疗开发等，满足您不同的研究需求。

► 产品验证数据

切割验证



注：上图为在 MDA-T41-Cas9 稳转细胞株上，慢病毒感染细胞靶向 OLFML2A 基因的 sgRNA 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，显示靶位点发生切割并导致基因型改变，说明 Cas9 核酸酶成功表达，且切割效率为 94%。

► 细胞接收

- 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保存，或直接进行细胞复苏。
- 活细胞：收到后用 75%的酒精对 T25 瓶外表面进行消毒，之后放在 5% CO_2、37℃的细胞培养箱静置 2 h，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，弃掉瓶内培养基，更换新鲜完全培养基。（培养瓶中灌满的细胞培养基不能继续用来培养细胞。）

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 24 h 内与我们联系。

► 细胞复苏

- 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；
- 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；
- 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；
- 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，500 xg 室温离心 4 分钟收集细胞；
- 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 6 cm^2 的皿)中，写上细胞名称、复苏日期、代次，放置 37℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱内培养。

► 细胞传代

贴壁细胞：

- 将完全培养基、PBS、胰酶预热至 37℃；
- 从培养容器中吸弃上清；
- 从容器一侧轻轻加入 PBS（T25 培养瓶加入约 2 mL）洗涤细胞 1 次。注意动作轻柔，清洗全面，避免搅动细胞层，前后摇晃容器数次吸去 PBS（注：冲洗步骤可去除可能抑制解离剂作用的少量血清、钙和镁）；
- 加入胰酶（T25 培养瓶加入约 1 mL），摇晃均匀，保证充分接触细胞表面。放入培养箱消化；
- 显微镜下观察消化情况，约 70%～80%细胞收缩变圆后，轻拍培养容器外壁，使细胞脱离培养表面；
- 立即加入 2-3 倍胰酶体积的完全培养基（T25 培养瓶加入约 3 mL），随即轻摇培养容器，使培养基和胰酶迅速混匀，终止消化；
- 使用移液管吸取细胞悬液，吹打培养容器底面数次，尽可能将细胞都吹打下来；注意：吹打动作不可剧烈，避免产生大量气泡，损伤和损失细胞。
- 收集的所有细胞悬液以 500 g 离心 5 min；
- 离心后去除上清。加入 1 mL 完全培养基，轻柔吹打细胞沉淀，充分吹散、混匀；
- 将细胞按一定的比例传代接种，建议首次按照 1:2 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；

注意：请根据细胞实际生长情况调整传代比例。

- 摇匀细胞，放入 37℃、5%CO_2 的培养箱中（如果使用培养瓶，将其放入培养箱前应将瓶盖旋松，以便进行充分的气体交换，除非您使用的是通气式培养瓶和透气性瓶盖）；
- 传代次日，观察细胞状态。若发现较多死细胞，进行换液操作。之后，每天根据细胞的生长情况更换完全培养基，观察细胞，生长至 80%以上的汇合度，即需传代或冻存。

注意：为了维持 Cas9 基因表达量的稳定，建议传代时半药维持。

悬浮细胞：

- 将完全培养基、PBS、胰酶预热至 37℃；
- 使用移液管吸取细胞悬液，吹打培养容器底面数次，尽可能将细胞都吹打下来；注意：吹打动作不可剧烈，避免产生大量气泡，损伤和损失细胞。
- 收集的所有细胞悬液以 500 g 离心 4 min；
- 离心后去除上清。加入 1 mL 完全培养基，轻柔吹打细胞沉淀，充分吹散、混匀；
- 将细胞按一定的比例传代接种，建议首次按照 1:2 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；

注意：请根据细胞实际生长情况调整传代比例。

- 摇匀细胞，放入 37℃、5%CO_2 的培养箱中（如果使用培养瓶，将其放入培养箱前应将瓶盖旋松，以便进行充分的气体交换，除非您使用的是通气式培养瓶和透气性瓶盖）；
- 传代次日，观察细胞状态。若发现较多死细胞，进行换液操作。之后，每天根据细胞的生长情况更换完全培养基，观察细胞，生长至 80%以上的汇合度，即需传代或冻存。

注意：为了维持 Cas9 基因表达量的稳定，建议传代时半药维持。

半贴壁半悬浮细胞：

- 将完全培养基、PBS、胰酶预热至 37℃；
- 使用移液管吸取细胞悬液，吹打培养容器底面数次，尽可能将细胞都吹打下来；注意：吹打动作不可剧烈，避免产生大量气泡，损伤和损失细胞。
- 从容器一侧轻轻加入 PBS（T25 培养瓶加入约 2 mL）洗涤细胞 1 次。注意动作轻柔，清洗全面，避免搅动细胞层，前后摇晃容器数次吸去 PBS（注：冲洗步骤可去除可能抑制解离剂作用的少量血清、钙和镁）；
- 加入胰酶（T25 培养瓶加入约 1 mL），摇晃均匀，保证充分接触细胞表面。放入培养箱消化；

- 显微镜下观察消化情况，约 70%～80%细胞收缩变圆后，轻拍培养容器外壁，使细胞脱离培养表面；
- 立即加入 2-3 倍胰酶体积的完全培养基（T25 培养瓶加入约 3 mL），随即轻摇培养容器，使培养基和胰酶迅速混匀，终止消化；
- 使用移液管吸取细胞悬液，吹打培养容器底面数次，尽可能将细胞都吹打下来；注意：吹打动作不可剧烈，避免产生大量气泡，损伤和损失细胞。
- 收集的所有细胞悬液以 500 g 离心 5 min；
- 离心后去除上清。加入 1 mL 完全培养基，轻柔吹打细胞沉淀，充分吹散、混匀；
- 将细胞按一定的比例传代接种，建议首次按照 1:2 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；

注意：请根据细胞实际生长情况调整传代比例。

- 摇匀细胞，放入 37℃、5%CO_2 的培养箱中（如果使用培养瓶，将其放入培养箱前应将瓶盖旋松，以便进行充分的气体交换，除非您使用的是通气式培养瓶和透气性瓶盖）；
- 传代次日，观察细胞状态。若发现较多死细胞，进行换液操作。之后，每天根据细胞的生长情况更换完全培养基，观察细胞，生长至 80%以上的汇合度，即需传代或冻存。

注意：为了维持 GFP 基因表达量的稳定，建议传代时半药培养。

► 细胞冻存

- 按细胞传代的方法，收集细胞沉淀，根据沉淀大小加入适量培养基重悬细胞。
- 用移液管吹打混合均匀，取 20 μL 进行细胞计数；
- 500 g 室温离心 5 min，离心后，打开盖子吸去上清，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；
- 将细胞悬液按 1 mL 每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；
- 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；
- 过夜后，将冻存细胞转移至液氮罐内保存。