

# hiPSC-CAS9 细胞培养说明书

## 一、产品简介:

hiPSC-CAS9 细胞株是将含 Cas9 蛋白基因的载体转染进 hiPSC 细胞中, 通过药物筛选, 得到长期稳定表达的 hiPSC-CAS9 稳转细胞株。贴壁生长, 呈克隆状, 半药浓度 H=50ug/ml, 可在 hESC/iPSC 完全培养基中快速增殖。包装规格为 1mL 冻存管, 含量为 >1x10<sup>6</sup> 个/mL, 且支原体、细菌、酵母和真菌检测为阴性。

该细胞株稳定表达 Cas9 核酸酶, 通过转染 gRNA 可实现基因敲除, 转染 gRNA 和供体 DNA, 可实现基因敲入/点突变。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, 可能会降低 Cas9 的表达。因此, 我们提供低代次 (10 代以内) 的细胞, 保证实验效果。

为了维持 Cas9 基因表达量的稳定, 建议传代时使用半药培养。

## 二、试剂准备:

### 1) hESC/iPSC 完全培养基配制 (500 mL)

1. 在 4℃ 条件下解冻 hESC/iPSC Growth Supplements A/B, 勿在 37℃ 培养箱/水浴锅解冻。
2. 参考表 1 在生物安全柜中, 使用无菌移液管混匀下列成分配制成 hESC/iPSC 完全培养基, 之后置于 4℃ 储存, 封口膜封好后 2 周内使用。
3. 有初培养需扩建的需求, 建议先配置 100 mL, 保证 2 周内使用完毕。

表 1: hESC/iPSC 完全培养基配置说明\*

组分	500 mL	100 mL	50 mL
hESC/iPSC Basal Medium	400 mL	80 mL	40 mL
hESC/iPSC Growth Supplements A	20 mL	4 mL	2 mL
hESC/iPSC Growth Supplements B	80 mL	16 mL	8 mL

可根据实际用量将 hESC/iPSC Growth Supplements A/B 分装后冷冻保存。具体配置比例可参考表 3 的配置说明。hESC/iPSC Growth Supplements A/B 冻融总次数不能超过 2 次。

### 2) Matrigel 铺板 (以货号为 354277 的 Corning® Matrigel® 包被 6 孔板为例)

#### A. 分装 Matrigel

1. 货号 354277 的 Matrigel, 操作说明中不标注蛋白浓度, 而是以 Dilution Factor 表示, 如某批次的推荐 Dilution Factor 为 278 μL, 则表明 278 μL 可包被 4 块 6 孔板, 分装数量=5 mL / 0.278=17.98。
2. 准备 18 个无菌 1.5 mL EP 管, 标记 Matrigel 日期、操作人; 1mL 无菌吸头; EP 管架, 均置于 -20℃ 冰箱中预冷 1 小时。

3. 将 Matrigel 放置 4℃ 冰箱过夜解冻，当 Matrigel 完全解冻即可开始分装。

注：在解冻时，将 Matrigel 放置冰箱内侧角落，切勿放在靠近冰箱门附近。

4. 准备一个装满碎冰的冰盒，将解冻过的 Matrigel、预冷的 1.5 mL EP 管及 EP 管架、1mL 吸头放置于生物安全柜上。

5. 混匀 Matrigel，无菌分装于各个 1.5 mL EP 管中，并置于冰上。当吸头被堵塞可能导致分装体积不准时需要更换吸头。

6. 将分装后的 Matrigel 置于 -20℃ 冰箱中保存。

## B. 铺板

1. 取 36 mL 冷藏 DMEM/F12 于 50 mL 离心管中，准备 4 个 6 孔板，标记 Matrigel、批号、日期和操作人。

2. 1 mL 无菌吸头置于 -20℃ 冰箱中预冷 1 小时，取出一支冷冻的 Matrigel (278μL) 置于 4℃ 冰箱解冻至完全化冻。

3. 准备一个装满碎冰的冰盒，将解冻过的 Matrigel、预冷的 1mL 吸头放置于生物安全柜上。

4. 用预冷吸头向解冻过的 Matrigel (278μL) 加入 1 mL 冷的 DMEM/F12 并反复吹打解冻混匀。

5. 吸出已解冻混匀的 Matrigel 加入离心管中剩余的 DMEM/F12，使用 10 mL 移液管再次反复吹打混匀。

6. 分装 1.5 mL/孔于 4 个六孔板中，轻轻摇晃混匀。

7. 培养板置于室温 1 小时后即可使用，或置于 4℃ 冷藏过夜，两周内使用。

## 三、细胞培养操作：

### 1) 复苏 hESC/iPSC (以 6 孔板为例)

1. 将水浴锅预热至 37℃；并将 Matrigel 包被的 6 孔板，提前放置生物安全柜中约 1 小时恢复至室温 (15~30℃)。

3. 取 2 mL hESC/iPSC 完全培养基，加入 hESC/iPSC Supplement C 终浓度为 10uM，恢复至室温 (15~30℃)。

注意：不要在 37℃ 水浴锅中预温培养基。

4. 取出 1 支冷冻的细胞置于 37℃ 水浴锅手持轻轻摇晃，2 min 内解冻，肉眼观察细胞悬液内冰晶即将完全消失时取出。

5. 75%酒精无尘纸擦拭冻存管表面，转入生物安全柜；将细胞悬液移到事先准备好的 15 mL 离心管中，随后缓慢逐滴加入 10mL DMEM/F12，过程中轻柔晃动混匀细胞，160g 离心 5 min。

6. 吸弃上清，加入预温的 2 mL 的 hESC/iPSC 完全培养基+hESC/iPSC Supplement C 制备细胞悬液，尽量避免吹打。

注：可留 20  $\mu$ L 上清液，轻弹管底，使细胞悬浮液更均匀，避免成较大细胞团。

7. 吸除 6 孔板中 1 孔的 Matrigel 包被液，将细胞悬液按照 2 mL/孔接种到 1 个孔中。

8. 水平十字摇匀三次，置于 37 $^{\circ}$ C，5% CO<sub>2</sub> 浓度，饱和湿度的培养箱中，再次水平十字摇匀三次培养。

9. 18-24 小时后换新的 hESC/iPSC 完全培养基，之后每天更换培养基。

注：在 hiPSC 培养过程中，如果细胞的汇合度超过 50%，建议更换培养基时，培养基的体积增加至 3-4mL/孔。

表 2: hESC/iPSC 传代&培养操作试剂推荐用量

培养容器 (孔数)	底面积	DPBS (mL)	EDTA 传代工作液	hPSC 培养基*
6 孔板 (1 管/1 孔)	9.6 cm <sup>2</sup> /孔	2mL/孔	2 mL/孔	2 mL/孔
12 孔板 (1 管/2 孔)	4.5 cm <sup>2</sup> /孔	1mL/孔	1 mL/孔	1 mL/孔
24 孔板 (1 管/4 孔)	8 cm <sup>2</sup> /孔	0.5mL/孔	0.5 mL/孔	0.5 mL/孔

## 2) 传代 hESC/iPSC (以 6 孔板为例)

1. 传代条件：① 细胞汇合度达 85%左右 (如图 1(C-D)所示)，一般情况下每 3-4 天传代；  
② 细胞汇合度较低，生长密度分布不均匀。

注：即使克隆团较小、汇合度不足，也建议不要连续培养超过 5 天。

2. 传代比例：可根据细胞生长状态和实验需要按 1:5~1:12 的比例进行传代，如果细胞正常，克隆团汇合度 85%，大小均匀 (如图 1(C-D)所示)，建议按照 1:8 进行传代，如果密度偏低，则可降低传代比例；密度偏高，则增加传代比例。

注：1:8 传代就是 1 个孔瓶传 8 个孔 (以 6 孔板为例)。

3. 将 Matrigel 包被的 6 孔板，提前放置生物安全柜中约 1 小时恢复至室温 (~25 $^{\circ}$ C)。

4. 根据传代接种的孔数准备 2 mL/孔的 hESC/iPSC 完全培养基，加入 hESC/iPSC Supplement C 终浓度为 10 $\mu$ M，恢复至室温 (~25 $^{\circ}$ C)。

5. 将 Matrigel 包被的 6 孔板，提前放置生物安全柜中约 1 小时恢复至室温 (~25 $^{\circ}$ C)。

6. 将孔内培养基吸取，加入 2 mL/孔的 DPBS (不含钙镁)，轻轻摇晃并吸取。

7. 加入 2 mL/孔的 hESC/iPSC Passage Solution 使溶液完全覆盖孔底。

8. 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 5-6 min。

注：① 消化 5-6 min 后镜下观察细胞变化，当大部分细胞变亮变圆，且细胞尚未脱离基质或漂起时即可终止消化，若大部分细胞仍未变亮，则需要延长消化时间；

② 保持 6 孔板与培养箱金属隔板直接接触，使 6 孔板受热均匀，不要叠放。

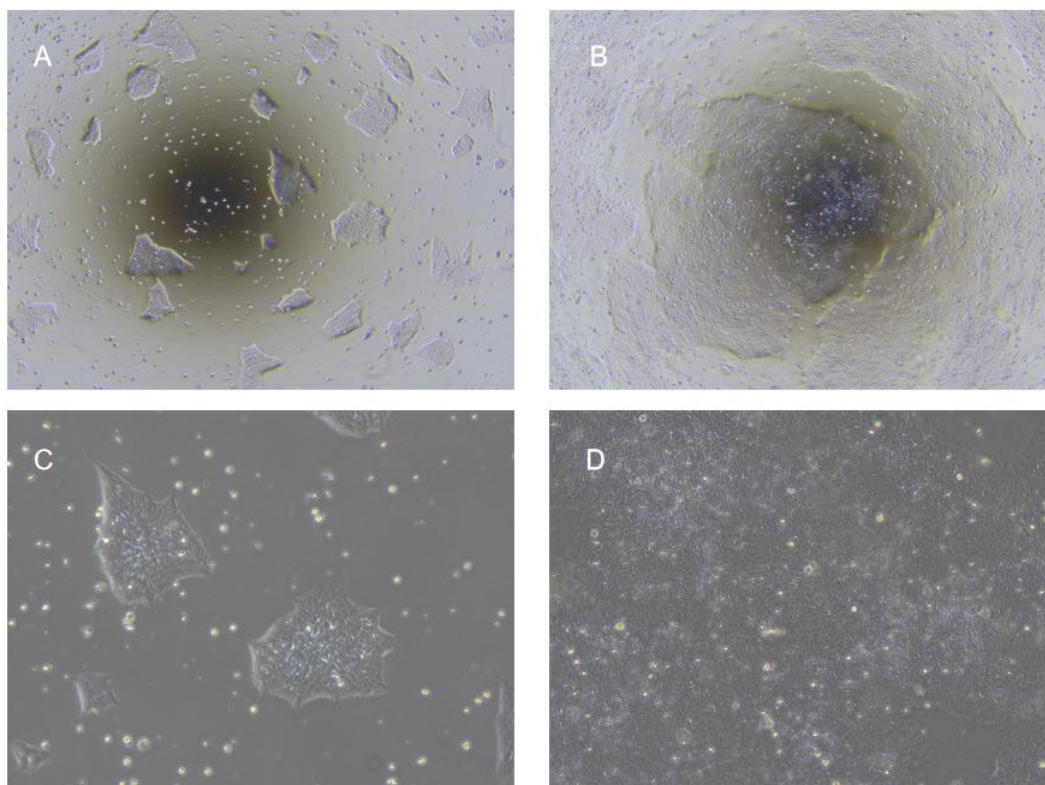
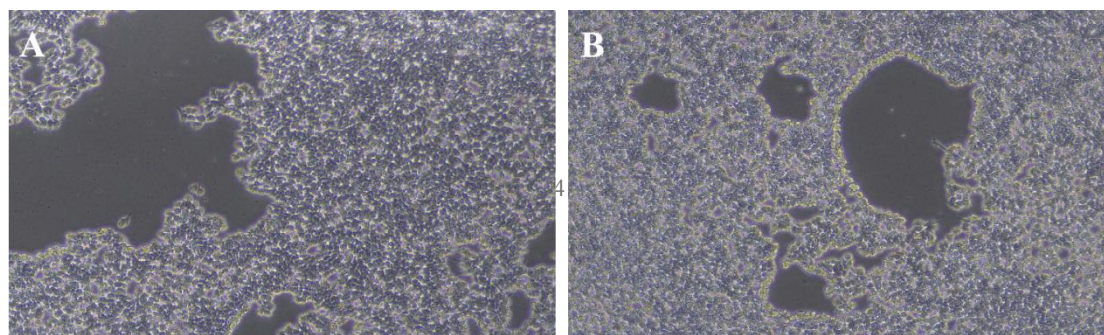


图 1. hESC/iPSC 完全培养基连续培养 hiPSC-CAS9 细胞形态图：（A）和（B）分别为 hiPSC-CAS9 细胞培养第 2 和 4 天时低倍镜 hiPSC 培养形态图示，（C）和（D）为培养至第 2 和 4 天时的高倍镜 hiPSC-CAS9 培养形态图。

9. 消化结束后轻轻地将细胞培养板拿回生物安全柜，避免震荡摇晃细胞，倾斜并吸除 hESC/iPSC Passage Solution。

10. 及时加入 2 mL/孔预温的 hESC/iPSC 完全培养基+ hESC/iPSC Supplement C，水平十字摇晃 6 孔板使细胞脱离基质。

注：① 加 hESC/iPSC 完全培养基 + hESC/iPSC Supplement C 时，可轻柔吹打细胞 1-2 次，不能超过 2 次，避免反复吹打；有部分细胞（10%~15%）未脱离基质是正常现象，若有大量细胞未脱离则需延长消化时间（< 10min）。



**图 2: 消化 hiPSC 细胞不同时间形态图: (A) 消化 5 min 低倍镜 hiPSC 培养的的形态图; (B) 消化 6 min 低倍镜 hiPSC 培养的的形态图。**

② hiPSC 细胞不能长时间处于 hESC/iPSC Passage Solution (<15 min), 所以收集接种细胞时操作必须快速,以及最好一次操作不要超过 4 孔(六孔板)。

11. 吸取 6 孔板中的 Matrigel 溶液, 加入预温的 hESC/iPSC 完全培养基+ hESC/iPSC Supplement C 2 mL/孔。

12. 在 6 孔板上标记细胞名称、代次、传代比例、日期、操作人。将步骤 9 获得的细胞悬液轻轻摇匀, 按预先设定的传代比例均匀分配于孔板中。

注: 为了铺板均匀并降低对细胞的损伤, 可以将步骤 8 获得的细胞悬液收集至 2mL 离心管, 轻柔颠倒混匀细胞 1-2 次; 再按照传代比例接种。

13. 接种后, 水平十字摇匀 6 孔板三次, 置于 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 浓度, 饱和湿度的培养箱中, 再次水平十字摇匀 6 孔板三次, 培养过夜。

14. 18-24 小时后更换新 hESC/iPSC 完全培养基, 此后每天换液, 4-5 天后继续传代/冻存。

### 3) 冻存 hESC/iPSC (以 6 孔板为例)

1. 当细胞汇合度达 85%左右(如图 1(C-D)所示)可收获冻存, 一般 6 孔板每孔可冻存 1 管。

2. 准备相应数量的 1.5/2 mL 冻存管, 标记细胞名称、代次(P#)、日期、操作人。

3. 取出 4°C 冰箱中的 hESC/iPSC Cryopreservation Solution, 置于室温预温, 使用前注意**摇匀**。

4. 吸取上清液, 加入 2 mL/孔的 DPBS (不含钙镁), 轻轻摇晃数次, 再吸取。

5. 加入 2 mL/孔的 hESC/iPSC Passage Solution, 将细胞置于 37°C 培养箱中, 计时 5-6 min (可参考“六、传代 hESC/iPSC”步骤)。

6. 消化结束, 轻轻取出培养板, 吸取 hESC/iPSC Passage Solution。

7. 摇匀预温的 hESC/iPSC Cryopreservation Solution, 每孔加入 1 mL 冻存液, 轻柔吹打, 水平十字摇匀 3 次, 随后吸取细胞悬液加入 1.5/2 mL 冻存管中。

8. 将细胞置于梯度程序降温盒中, 并置 -80°C 冰箱中过夜, 次日转入液氮罐中长期保存。

## 四、收货注意事项:

1. 收到细胞后首先观察细胞瓶是否完好, 培养液是否有漏液、浑浊等现象, 干冰运输的细

胞检查干冰是否完全挥发，细胞是否解冻，若有上述现象发生请及时和我们联系。

2. 仔细阅读细胞说明书，了解细胞相关信息，如细胞形态、所用培养基、血清比例、所需细胞因子等，确保细胞培养条件一致，若由于培养条件不一致而导致细胞出现问题，责任由客户自行承担。

3. 请客户用相同条件的培养基用于细胞培养。

4. 建议客户复苏细胞后前3天各拍几张细胞照片，记录细胞状态，便于和我司技术部沟通交流。由于运输的原因，细胞会出现不稳定的情况，请及时和我们联系，告知细胞的具体情况，以便我们的技术人员跟踪回访直至问题解决。

5. 该细胞仅供科研使用。