

hiPSC-CAS9 细胞培养

Cat NO: IM-H680

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 $>1 \times 10^6$ 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。

试剂准备

1) hESC/iPSC 完全培养基配制（500 mL）

1. 在 4°C 条件下解冻 hESC/iPSC Growth Supplements A/B，勿在 37°C 培养箱/水浴锅解冻。
2. 在生物安全柜中，使用无菌移液管将 hESC/iPSC Growth Supplements A/B 与 hESC/iPSC Basal Medium 混匀配制成 hESC/iPSC 完全培养基，之后根据使用情况将培养基分装，封口膜封好，确保置于 4°C 储存的培养基 2 周内使用完毕，其余培养基于 -20°C 冷冻保存，需要时提前于 4°C 过夜解冻。

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 μ L，则表明 278 μ L 可包被 4 块 6 孔板，分装数量 = $5 \text{ mL} / 0.278 = 17.98$ 。
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°C 冰箱中预冷 1 小时。
3. 将 Matrigel 放置 4°C 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、预冷的 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. 取冷藏的 36 mL DMEM/12 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 (278 μL) 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 (278 μL) 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，急用时可放置培养箱 40 分钟。

细胞培养操作

1) 复苏 hiPSC CAS9 (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。



2. 取 2 mL hESC/iPSC 完全培养基，加入 4uL hESC/iPSC Supplement C 使终浓度为 10uM，取 9mL DMEM/F12，加入 18uL hESC/iPSC Supplement C 使终浓度为 10uM，恢复至室温。

注意：不要在 37°C 水浴锅中预温培养基。

3. 取出 1 支冷冻的细胞置于 37°C 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。

4. 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 9mL DMEM/F12，将离心管轻轻缓慢上下颠倒混匀，160g 离心 5 min。

5. 吸除 6 孔板中 1 孔的 Matrigel 包被液，加入 2mL 含有 hESC/iPSC Supplement C 的 hESC/iPSC 完全培养基。

6. 离心完吸弃上清，至留下 50uL 左右的上清，轻弹管底 3-4 下至细胞混匀在上清中，逐滴缓慢加入 1mL 含有 hESC/iPSC Supplement C 的 hESC/iPSC 完全培养基，轻弹管底 3-4 下混匀细胞，将这 1mL 细胞悬空滴加进 6 孔板的含有 hESC/iPSC Supplement C 的 hESC/iPSC 完全培养基中。

7. 水平十字摇匀三次，置于 37°C，5% CO₂ 浓度，饱和湿度的培养箱中，再次水平十字摇匀三次培养。

注：水平十字摇匀 3 次，左右两次+上下两次算一次。

8. 18-24 小时后换新的 hESC/iPSC 完全培养基，之后每天更换培养基。

表 1: 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)	传代工作液	hPSC 培养基*
6 孔板 (1 管/1 孔)	9.6 cm ² /孔	1mL/孔	1 mL/孔	2 mL/孔
12 孔板 (1 管/2 孔)	4.5 cm ² /孔	0.5mL/孔	0.5 mL/孔	1 mL/孔
24 孔板 (1 管/4 孔)	2 cm ² /孔	0.3mL/孔	0.3 mL/孔	0.5 mL/孔

2) 传代hiPSC CAS9 (以 6 孔板为例)



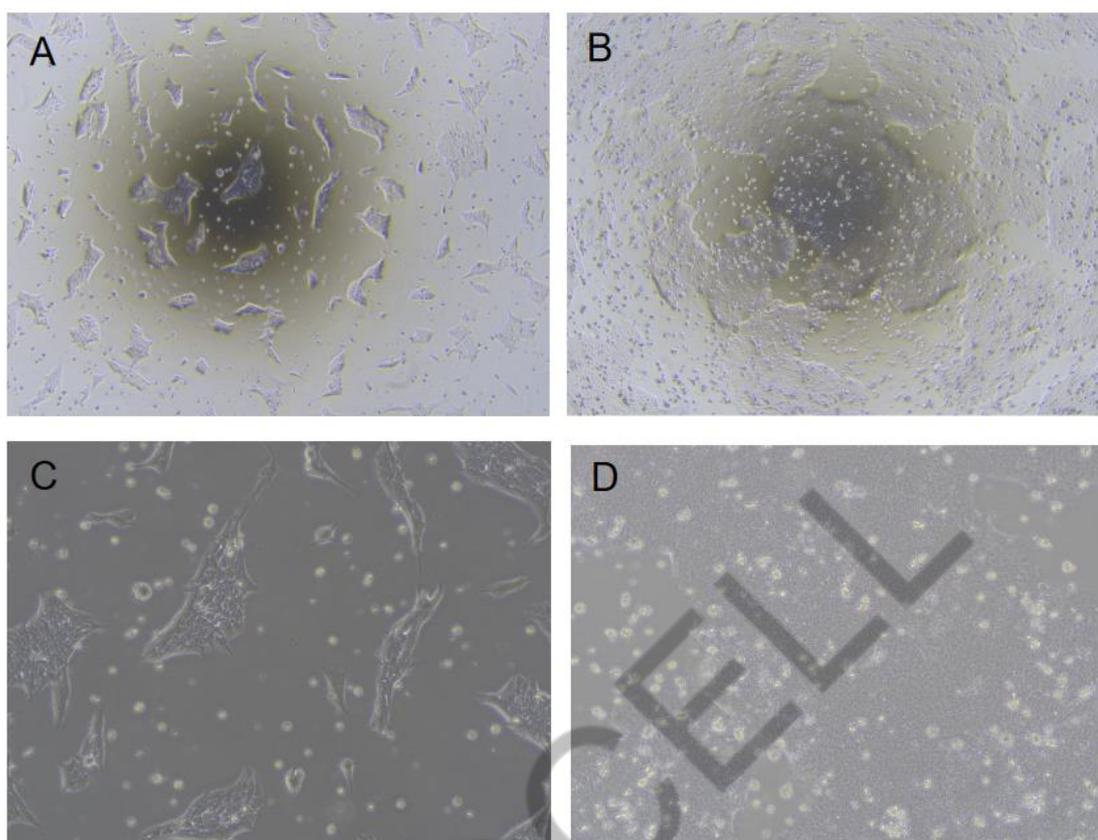


图 1：传代第 1 天和第 4 天的细胞状态 (A) hiPSC CAS9 4 倍镜下第 1 天的状态；(B) hiPSC CAS9 4 倍镜下第 4 天的状态；(C) hiPSC CAS9 10 倍镜下第 1 天的状态；(D) hiPSC CAS9 10 倍镜下第 4 天的状态。

1. 传代条件：① 细胞汇合度达 85%左右（如图 1(B-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(B-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 个孔传 8 个孔（以 6 孔板为例）。

3. 将 Matrigel 包被的 6 孔板，hESC/iPSC Passage Solution，DPBS提前放置生物安全柜中约 1 小时恢复至室温（~25℃）。

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 10uM，恢复至室温（~25℃）。

5. 将细胞六孔板孔内培养基吸弃，加入 1 mL/孔的DPBS（不含钙镁），轻轻摇晃后吸弃。

6. 加入 1 mL/孔的 hESC/iPSC Passage Solution使溶液完全覆盖孔底。

7. 置于 37℃培养箱中孵育 5-7 min。

注：① 消化 5-7 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若大部分细胞仍未变亮，则需要延长消化时间；hiPSC CAS细胞不能长时间处于 hESC/iPSC Passage Solution（<10 min）。

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。

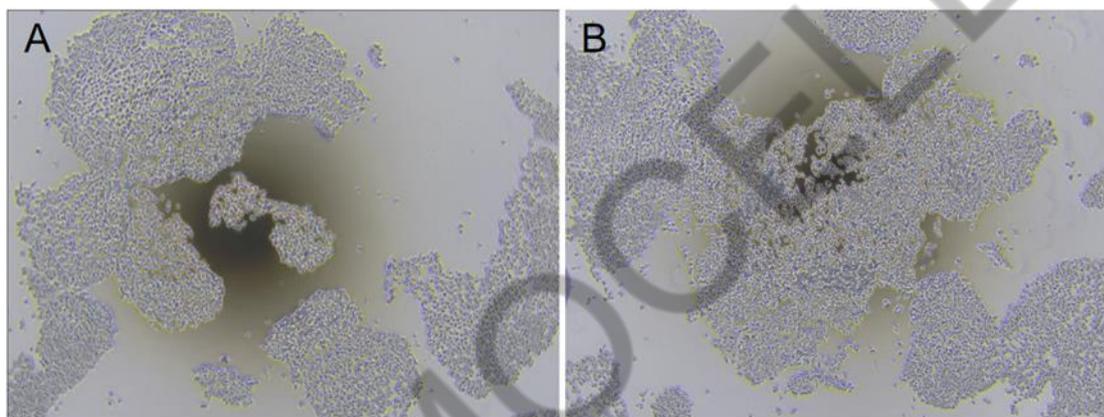


图 2：消化 hiPSC CAS9 细胞不同时间形态图：（A）消化 6 min 低倍镜 hiPSC CAS9 培养的的形态图；（B）消化 7min 低倍镜 hiPSC CAS 培养的的形态图。

8.消化时，吸弃含有 Matrigel 的铺板培养基

9. 消化结束后，轻轻拍打板侧（每侧拍两下），把细胞拍下来，再在生物安全柜中，加入 1mL 含有 hESC/iPSC Supplement C 的 hESC/iPSC 完全培养基终止消化，把这 2mL 体系吸入 15mL 离心管离心 200g 1min，吸弃上清至剩余几十微升，轻弹孔底 3-4 下，让细胞沉淀溶于上清，往孔板里加 2mL 培养基，再加入 1mL 含有 hESC/iPSC Supplement C 的 hESC/iPSC 完全培养基到含有细胞的 15mL 离心管里，轻弹 3-4 下，混匀即可，把这一毫升细胞悬液悬空滴加入板里的培养基，每孔 3-5 滴。在 6 孔板上标记细胞名称、代次、传代比例、日期、操作人，水平十字摇匀 3 次。

注：可将传完代后的细胞在镜下观察细胞密度，根据密度调整是否需要多加细胞滴。



10. 置于 37℃，5% CO₂ 浓度，饱和湿度的培养箱中，再次水平十字摇匀 3 次，不要叠放。

11. 18-24 小时后换新的 hESC/iPSC 完全培养基，此后每天换液，第 4 天继续传代/冻存。

注：传代后隔天算第 1 天。

3) 冻存 hiPSC CAS9 (以 6 孔板为例)

1. 当细胞汇合度达 85% 左右 (如图 1(B-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℃ 冰箱中的 hESC/iPSC Cryopreservation Solution，使用前注意摇匀。

4. 吸取上清液，加入 1 mL/孔的 DPBS (不含钙镁)，轻轻摇晃数次，再吸取。

5. 加入 1 mL/孔的 hESC/iPSC Passage Solution，将细胞置于 37℃ 培养箱中，计时 5-7 min (可参考“三 (2)、传代 hESC/iPSC”步骤)。

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

7. 混匀含有终浓度为 10uM 的 hESC/iPSC Supplement C 的 hESC/iPSC Cryopreservation Solution，每孔加入 1 mL，轻柔吹打，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℃ 冰箱中过夜，次日转入液氮罐中长期保存。

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。

