

Hela-dCas9-VP64-MPH 细胞说明书

货号: C1209

培养基: MEM (含 NEAA)培养基 (gibco 货号: 41500083) +10%胎牛血清, Blasticidin 5ug/ml, Hygromycin 100 ug/ml

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

细胞培养注意事项:

- 1、收到细胞后请尽快扩大培养, 批量冻存。
- 2、务必使用质量可靠的血清, 推荐使用进口血清。
- 3、抗生素可以在培养过程中一直添加。如果与实验冲突, 也可以不添加。

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 培养瓶或者 60mm 培养皿, 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:

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。

产品简介:

本细胞株产品是用两个慢病毒感染后，用抗生素筛选得到的稳定多克隆细胞株。用到的两个慢病毒载体分别为：

pLV-dCas9-VP64-Bsd: 表达无 DNA 酶活性的 dCas9 蛋白与转录激活因子 VP64 的融合蛋白。该融合蛋白与 sgRNA 结合后，将定位于细胞基因组 DNA 的特定位置，并产生转录激活作用。pLV-dCas9-VP64-Bsd 慢病毒载体表达 Bsd 抗性基因，转染细胞后，可以用 Blasticidin 筛选阳性细胞株。

pLV-MPH-Hygro: 表达 MS2/P65/HSF1 融合蛋白。与 sgRNA 结合并协同产生转录激活作用。pLV-MPH-Hygro 慢病毒载体表达 Hygromycin 抗性基因。

CRISPR-SAM 采用无 DNA 切割活性的 dCas9 蛋白融合 VP64 转录激活蛋白，加上能与 MS2 蛋白结合的 sgRNA2.0，特异性识别并结合含 sgRNA 靶点的启动子。MS2 蛋白连接 p65 和 HSF1 转录激活蛋白（MPH 融合蛋白）。通过多种转录激活蛋白的协同作用，能更好的摸底细胞内转录激活。

Hela-dCas9-VP64-MPH 细胞稳定表达 dCas9-VP64 融合蛋白和 MPH 融合蛋白。只需要转入配套的 sgRNA 表达质粒或者人工合成的 sgRNA 就能实现基因特异性转录激活。

细胞特性:

表达基因: dCas9-VP64, MPH 融合蛋白

基因导入方法: 慢病毒

筛选抗生素: Blasticidin, Hygromycin

细胞克隆: 多克隆细胞株

配套 sgRNA 序列:

```
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTCAGAGCTAGGCCAACATGAGGATCACCCATGTCTGCAGGGCCTAGCAAGTTGAAAT  
AAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGGCCAACATGAGGATCACCCATGTCTGCAGGGCCAAGTGGCACCGAGTCGGTGC
```

NNNNNNNNN: 靶点

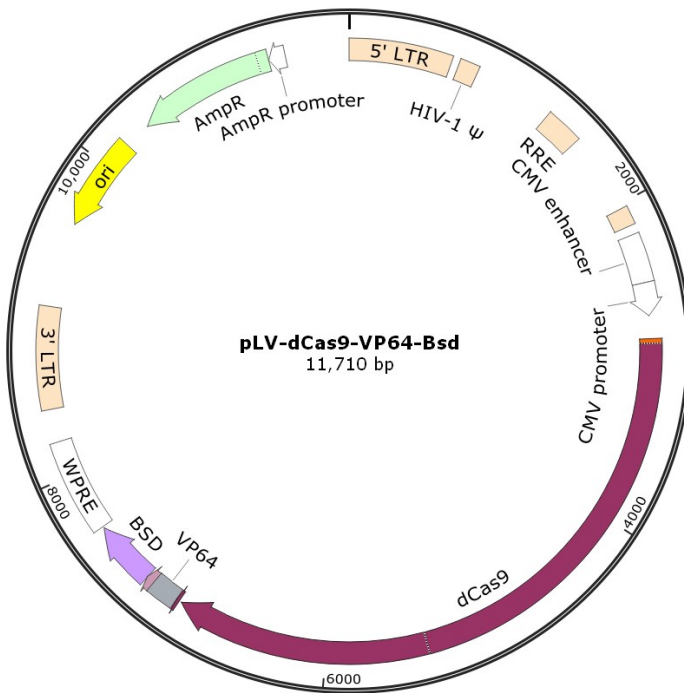
使用注意事项:

- 1、Hela-dCas9-VP64-MPH 细胞采用 Blasticidin 和 Hygromycin 筛选得到，后续细胞筛选实验不能采用者两种抗生素。

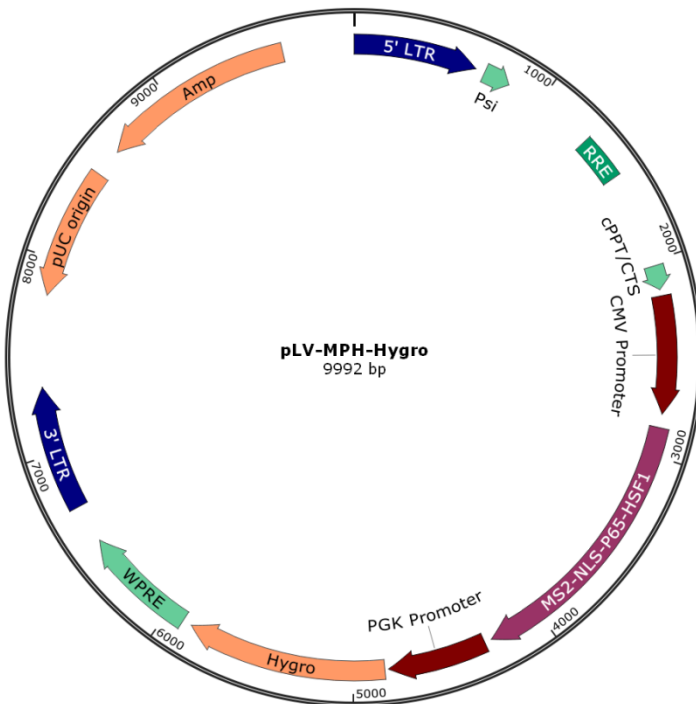
- 2、建议在培养过程中添加 Blasticidin 5ug/ml, Hygromycin 100 ug/ml。
- 3、CRISPR-SAM 系统使用的 sgRNA 与普通 sgRNA 不同。请参照相关文献或者本说明书的序列进行设计。可以采用质粒表达或者人工合成。对目的基因的启动子的不同位置同时使用 2-3 个靶点可能达到最佳的转录激活效果。
- 4、转录激活的效果与目的基因的本底表达量、靶点的位置和靶点周围序列、sgRNA 导入方法和效率等多种因素相关，使用中有必要根据实验具体情况进行修改实验条件，以获得更好的实验结果。

慢病毒载体图谱:

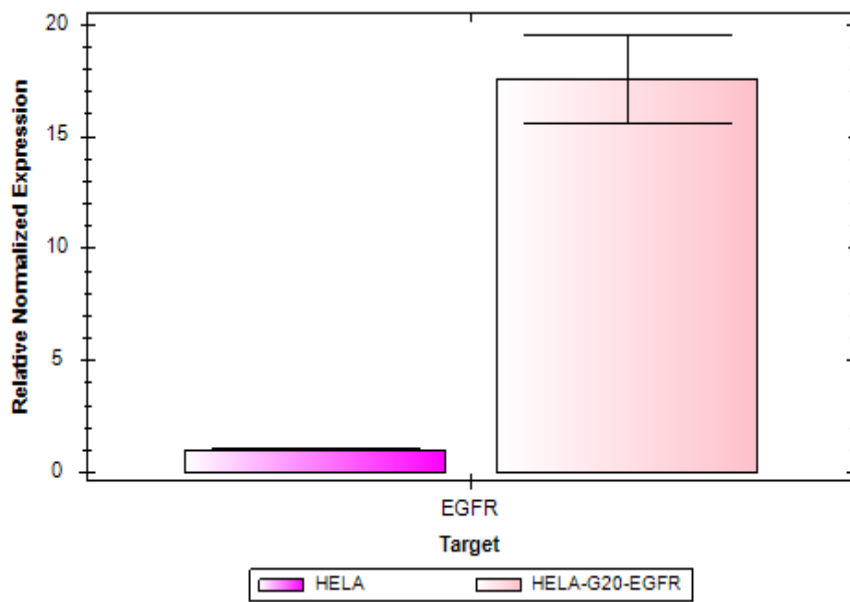
Created with SnapGene®



Created with SnapGene®



采用 HeLa-dCas9-VP64-MPH 细胞进行 EGFR 基因转录激活实验



sgRNA 采用慢病毒载体 pLV-SG20 导入。靶点序列：CCACCGCTGTCCACCGCCTC