

使用Lonza 4D-Nucleofector系统将核酸酶Cas9 Multi- NLS, *S. pyogenes* RNP(核糖核蛋白)电穿孔转染方法

货号: GUCN-R003

概述

Cas9核酸酶可用于靶向体内基因组修饰。有几种方法可将CAS9-gRNA复合物导入细胞中。在这里,我们介绍了一种使用LONZA 4D-Nucleofector将Cas9 RNP引入HEK293 FT细胞的方法。该方法使用gRNA蛋白质比为2:1。可以最低将皮摩尔级的RNA和蛋白质导入细胞。

材料

细胞培养和转染:

HEK293细胞(其他细胞系可能需要优化)在T-75培养瓶瓶中达到70-90%融合度

Cas9 Multi- NLS, *S. pyogenes* (Cat.No: GUCN-R003)

sgRNA含有感目标区域中的靶向序列

Lonza 4d-nucleofector™体系

SF Cell Line 4d-nucleofector®X试剂盒

无菌无Ca²⁺和Mg²⁺+1x PBS

胰蛋白酶

10%FBS含谷氨酸(或适当的生长培养基) DMEM

在你开始之前

- 我们强烈建议戴手套和使用核酸酶的管和试剂以避免RNase污染。这里可以在这里找到避免核糖核酸酶污染的进一步建议。
- 请参阅Lonza 4d-nucleofector手册,以适当使用设备。
- LONZA 4D-Nucleofector平台具有多种电穿孔体积可供选择。

流程

电转:

- 接种细胞,使它们在转染当天约为70-90%的融合度。
- 如下所示设置RNP反应体系。以下体积将允许一个(1)个电穿孔(添加细胞)为25μL。我们尚未发现有必要使用过量体积。
- 轻轻混合核溶液,Cas9 Multi- NLS和sgRNA,并在室温下孵育20分钟。
- 在孵育期间,使用胰蛋白消化细胞,并洗涤一次以除去残留胰蛋白酶。将细胞重新悬浮在5-10ml培养基中。用20μl台盼蓝稀释20μl细胞。使用血细胞计板确定活细胞数。
- 计算整个实验所需的细胞数量(每次转染的1-2×10⁵个细胞)并将那些转移到无菌微孔管中。细胞沉淀500×g离心5分钟。用1x PBS洗一次细胞并重复离心。

为科研加速,为工业赋能!



关注海星公众号



关注海星视频号



COMPONENT	25 μ l final with cells
Nucleofector Solution	10.0 μ l
Cas9 Multi- NLS (20 μM)	2.5 μ l
gRNA (50 μM)	2.0 μ l

6. 计算待转溶液的体积，您需要重新悬浮细胞（每次转染10.5 μ l）。使用计算好的溶液重新悬浮细胞。

7. 准备一个培养皿，加入适量的培养基。

8. 将10.5 μ l细胞加入到14.5 μ l的RNP反应管中，轻轻吹打细胞。

9. 将整个25 μ l的RNP /细胞混合物加入电转皿中。轻轻震荡以确保液体位于底部，并避免产生气泡。选择预先优化的HEK293细胞(CM-130)程序，电穿孔细胞。

10. 将75 μ l培养基加入电转皿中，轻轻吹打。将细胞悬液转移到培养板中的孔中。

11. 将细胞在37 $^{\circ}$ C，5%CO₂培养箱中培养48-72小时。

收集DNA并扩增目标区域：

1. 轻轻地从细胞中吸出培养基，用250 μ l 1X PBS洗两次。

2. 并提取基因组DNA。

3. 可以突变检测试剂盒或者ICE分析、流式分析进行编辑分析。

为科研加速，为工业赋能！

