(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

sgRNA+Cas9
慢病毒试剂盒产品使用说明书

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们:

✉邮箱（销售） order@enkilife.cn
✉邮箱（技术支持） tech@enkilife.cn
公司电话 027-87002838
网址 www.enkilife.cn

订阅微信公众号
获取更多技术
信息及前沿动态

产品简介

本产品基于 CRISPR-Cas9 技术原理，针对同一靶基因设计三条 sgRNA 序列，并完成慢病毒载体构建与病毒包装；载体同时携带 sgRNA 表达盒和 Cas9 编码序列两个核心元件，依托慢病毒转导递送方式，可同步将 Cas9 和 sgRNA 递送至目的细胞内部。病毒感染细胞后，基于 CRISPR-Cas9 技术原理介导 DNA 发生双链断裂与修复过程引入错误，最终实现目标基因的功能缺失。本产品的病毒载体携带 Puro 抗性筛选标记，可通过 Puromycin 抗生素筛选得到有效转导的阳性细胞，能够支持多种哺乳动物细胞完成高效、稳定的基因敲除(Gene Knockout)。

❖ 产品信息

产品中文名称	三条 sgRNA+Cas9 慢病毒
产品货号	RC0243
病毒滴度	≥10^7TU/mL
规格	1mL*3
载体骨架信息	U6-sgRNA-EF1a-SpCas9-PuroR

❖ 试剂盒清单

名称	规格	保存条件
sgRNA1-Cas9	≥10^7TU/mL；1mL	-80℃；6 个月
sgRNA2-Cas9	≥10^7TU/mL；1mL	-80℃；6 个月
sgRNA3-Cas9	≥10^7TU/mL；1mL	-80℃；6 个月
慢病毒助染试剂(Polybrene)	10ug/uL；100uL	-20℃；12 个月

❖ 慢病毒产品使用安全指南

① 我司提供的慢病毒为重组复制缺陷型病毒；虽然如此，也需要按照要求进行谨慎操作。

② 慢病毒的相关实验推荐在生物安全柜(BL-2 级别)内操作，若使用普通超净工作台操作慢病毒，建议关闭风机再进行操作。

③ 操作慢病毒相关实验时必须穿实验服，佩戴口罩、手套及帽子。

④ 操作病毒时请小心操作，如果操作时病毒液漏出，请立即用 75%酒精擦拭干净。

⑤ 接触过病毒的枪头，离心管，培养板，培养液请用 84 消毒液浸泡后统一处理，病毒相关的废弃物需要特殊收集，需统一进行高温灭菌处理。

⑥ 病毒飞溅或是气溶胶与人体接触时，请用大量清水冲洗接触部位至少 15 分钟。

⑦ 如含病毒的针头或其他利器刺破皮肤，立即用 10%的碘伏溶液擦洗伤口数分钟，然后用大量清水冲洗。

⑧ 实验结束后请消毒手套，并清洗双手。

❖ 慢病毒储存与使用

① 慢病毒产品为干冰运输，收到产品之后，若产品报装无异常，请及时将病毒置于-80℃冰箱保存，-80℃可以保存半年；4℃储存 1-2 周；如需长期保存请分装后放置于-80℃。

② 如果病毒储存时间超过 6 个月，建议重新测定病毒滴度。

③ 在病毒使用过程中应避免反复冻融，反复冻融会降低病毒滴度。

④ 当需要稀释病毒时，请将病毒取出置于冰浴或者 4℃冰箱融化后，使用目的细胞的完全培养基或者无菌 PBS 进行稀释并及时使用。

❖ MOI 说明

① 最佳感染复数(MOI，multiplicity of infection),即合适的病毒粒子感染特定细胞的颗粒数；

② MOI 的选择可以参考：细胞状态不受影响的条件下，阳性细胞比例超过 80%的最少病毒量。MOI 是一个范围和细胞种类以及状态有关。

③ 在实验前，建议使用表达荧光蛋白的对照慢病毒来筛选合适的 MOI 值。

④ 估计实验所需的慢病毒颗粒用量，用确定的 MOI 计算所需病毒体积。

$$\text{慢病毒添加量（mL）} = \frac{\text{细胞数量} \times \text{MOI}}{\text{慢病毒滴度（TU/mL）}}$$

❖ Puromycin 抗性说明

① Puromycin 最佳筛选浓度：3-5 天能够 100%杀死野生型细胞的最低药物浓度。

② 实验前需要确定目的细胞的 Puromycin 最佳筛选浓度。

③ 筛选抗生素的最佳筛选浓度时，建议细胞不要接种的太密，细胞太密耐药会升高。

❖ 病毒转导细胞操作流程

① **准备目标细胞**：在合适的培养器皿中接种一定数量的靶细胞，放置于 37℃、5%CO_2 的培养箱中贴壁过夜。对于大多数细胞系，确保在转导时靶细胞的汇合度达到 30%~40%；对于某些生长缓慢或者不增殖的原代细胞，可以在接种时提高汇合度。

② **添加慢病毒（生物安全柜中操作）：**

a. 冰浴或在 4°C 冰箱内放置以融解病毒液，注意离心管盖的液体；

b. 细胞更换新鲜培养基；如实验细胞为悬浮细胞，则直接取合适数量的对数生长期的细胞接种至新鲜培养基中。培养基添加量可参考下表：

	96 well	24 well	12 well	6 well	T25 culture flask
正常培养体积	100 μL	500μL	1mL	2mL	7mL
感染时的体积	100 μL	300μL	500μL	1mL	2.5 -3.5mL

c. 通过 MOI 计算确定使用的病毒液体积，取用前轻柔吹打混匀溶解后的病毒液，吸取适量病毒液至培养容器中。

d. Polybrene（聚苯乙烯胺盐）是一种常用的阳离子聚合物: 通过中和电荷，可以有效提高病毒颗粒与细胞表面的接触频率。显著提高慢病毒转导效率，但对细胞也存在一定的毒性；Polybrene 不是必须的，如需使用，应测试不同时间和不同浓度的 Polybrene 对靶细胞的毒性，常规工作浓度范围为 2~10μg/mL。

e. 轻柔摇动培养容器，混匀病毒，加了病毒的细胞放置于 37℃、5% CO_2 的培养箱中培养过夜，注意观察培养基的量，避免因为培养基蒸发细胞干死。

f. 在病毒转导过夜后，给细胞更换新鲜的完全培养基，将细胞放置于 37℃、5% CO_2 的培养箱中继续培养。

g. 大部分细胞在转导 24~48 小时后，目的基因明显表达，可用抗生素筛选细胞；部分细胞需要病毒感染 48~72 小时后加入相应浓度的抗生素进行加压筛选。

备注：感染前细胞的状态好坏对最终的感染效果影响很大，所以务必保证在加慢病毒之前的细胞处于良好的生长状态。

❖ 编辑效果分析步骤

① 根据 sgRNA 结合位点，设计和订购 PCR 扩增引物。

② 抗性筛选完成后，对照组细胞和转染组细胞进行基因组提取。

③ 基因组 DNA 提取完成后，进行 PCR 扩增。

④ 扩增产物验证与 Sanger 测序准备

a. 通常用 1%左右的琼脂糖凝胶电泳验证 PCR 的扩增效果，确保对照组中获得单一且大小符合预期的条带；编辑样本可能会出现非单一条带，属于正常。

b. 切割目的条带的胶条或者纯化 PCR 扩增产物送测序.

c. 客户可利用常规生物信息分析软件对 Sanger 测序结果进行比对分析；也可以联系我司进行协助分析（encyto-pm1@enkilife.cn，来件请注明**产品编号**）。

❖ 附：产品售后说明

尊敬的客户，您好!

感谢您选择我们的产品，为保障您能享有完善的售后服务、确保产品相关问题得到妥善处理，特提供以下说明，希望对您有所帮助：

自您签收产品之日起两个月内，若您未就产品质量问题提出反馈，将默认该产品符合交付标准。若您在后续使用过程中遇到任何问题，请务必留存好对应问题的图片、数据凭证，并及时和我们联系，我们将第一时间响应，竭诚为您解决问题。

再次感谢您的支持与信任，衷心祝愿您工作顺利，顺颂研祺！