horizon

TECHNICAL MANUAL

Edit-R™ Cas9 and CRISPRmod CRISPRa dCas9-VPR 安定発現株

Cat.#	
HD Cas9-001	HD Cas9-014
HD Cas9-002	HD dCas9-VPR-001
HD Cas9-004	HD dCas9-VPR-002
HD Cas9-005	HD dCas9-VPR-005
HD Cas9-007	HD dCas9-VPR-011
HD Cas9-010	HD dCas9-VPR-012
HD Cas9-011	HD dCas9-VPR-014
HD Cas9-012	

製造

Cas9およびdCas9-VPR安定発現細胞株は、Edit-R Cas9ヌクレアーゼレンチウイルス粒子またはCRISPRmod CRISPRa dCas9-VPRレンチウイルス粒子を使用した形質導入とそれに続く14日間のブラストサイジン選択によって作製されました（Appendix Table 4の濃度を参照）。Cas9およびdCas9-VPR安定発現接着細胞株は、1 mLの凍結培地（50%ウシ胎児血清（FBS）および5% DMSOを含む）に1×10^6を超える生細胞を含む単一のバイアルとして提供されます。Cas9およびdCas9-VPR安定発現浮遊細胞株であるJurkatおよびK-562は、1 mLの凍結培地（50% FBSおよび10% DMSOを含む）に1×10^6を超える生細胞を含む単一のバイアルとして提供されます。

出荷および保管

Cas9およびdCas9-VPR安定発現細胞株は、ドライアイスで出荷されます。輸送中にCO_2がバイアルに入るのを防ぐための予防措置が講じられていますが、受け取ったら、細胞を液体窒素で2日以上保管して、CO_2を放散させることをお勧めします。液体窒素貯蔵庫からバイアルを取り出すときは、室温で約30秒以上放置して、液体窒素がバイアルから放散されるようにします。注：液体窒素で保管されたバイアルを取り扱うときは、常に保護眼鏡と手袋を着用してください。

品質管理

Cas9およびdCas9-VPR安定発現細胞株は、生存率がテストされ、マイコプラズマに汚染されていないことが確認されています。Cas9およびdCas9-VPR活性は、化学合成されたポジティブおよびネガティブコントロールガイドRNAによる一過性トランスフェクション後、それぞれ順に機能的遺伝子編集アッセイおよびRT-qPCRアッセイによって確認されています。品質管理措置は、バッチ固有の分析証明書（Certificate of Analysis）に記載されています。

凍結細胞ストックから細胞培養を開始します（すばやく解凍します）

1. Cas9あるいはdCas9-VPR安定発現細胞株を液体窒素から取り出し、ほぼ（～80%）解凍するまで37 °Cのウォーターバスに2分間入れます。
2. バイアルから細胞を取り出し、あらかじめ温めた9 mLの細胞培養培地を含む15 mLコニカルチューブにゆっくりと加えます（Appendix Table 2を参照）。
3. 300×gで4分間遠心分離して細胞をペレット化し、上清を取り除きます。
4. 2mLの適切な細胞培養培地を追加し、あらかじめ温めた4 mLの細胞培養培地を含むT25フラスコに細胞を移します。
5. 細胞を加湿された5%CO_2・37°C設定のインキュベーターに入れます。
6. 付着細胞株の場合、24時間後に培地を5～10 mLの適切な細胞培養培地と穏やかに交換し、5%CO_2・37°Cで培養を続けます。浮遊細胞株（K-562およびJurkat）の場合、細胞数と生存率チェックを実行するために、1x10^6細胞/mLに近づくまで細胞を数日間回復させます。（培養物は1 x10^6細胞/mLを超えてはなりません。）

細胞の継代培養

目的のアプリケーションで使用する前に、少なくとも1回は細胞を継代することをお勧めします。以下に記載の継代培養プロトコールでは、標準的なT75細胞培養フラスコで細胞を継代する際の細胞培養ガイドラインおよび液量を説明しています。異なるフラスコまたはプレートを使用する場合は、メーカーのガイドラインに従って培養量を増減する必要があります。

Cas9およびdCas9-VPRを安定発現する付着性細胞株

細胞株：A549、HCT-116、RKO、NIH / 3T3、HAP1、U2OS、およびMDA-MB-231

細胞株は通常、70～90%のコンフルエントになった時に継代します。各細胞株の詳細については、付録の表2を参照してください。

1. .細胞から増殖培地を注意深く吸引します。これは、細胞表面に触れずに、フラスコまたはプレートを傾けて培地を除去することによって行うのが最適です。
2. 7.5 mL PBSで細胞を穏やかに洗浄し、残りの培地を除去します。
3. 3 mLのトリプシン-EDTA溶液（GIBCO、カタログ番号25300096）で細胞をトリプシン処理します。約2分間、または細胞がフラスコから離れるまで、37°Cのインキュベーターにフラスコを置きます。

4. 付録（表2）に記載されている適切な細胞培養培地15〜30 mLを加えて、剥離した細胞を再懸濁し、トリプシンを不活化します。
5. 培地の泡立ちを避けながら、細胞を10 mLピペットで約5回上下にピペッティングして、単一細胞懸濁液を取得します。
6. 付録（表2）で推奨されている分割比に従って、適切な細胞培養培地を含む新しい滅菌フラスコまたはプレートに細胞を播種します。細胞を加湿された5%CO2・37°C設定のインキュベーターに入れます。

Cas9およびdCas9-VPRを安定発現する浮遊細胞株

細胞株：JurkatおよびK-562

細胞株は通常、1 x 10^5〜1x10^6生細胞/mLの細胞密度で維持します。各細胞株のより具体的な詳細は、Appendix Table 2に記載されています。

1. 細胞が培地に均一に分布していることを確認し、細胞懸濁液から細胞の少量のサンプル（例えば100 µL）を注意深く採取し、セルカウンターを使用して生細胞の総数を決定します。
2. 以下の式を使用して、1 x10^5細胞/mLの播種密度に到達するために必要な適切な細胞培養培地（Appendix Table 2を参照）の量を計算します。

$$\text{新鮮な培地の容量} = \frac{\text{細胞密度x細胞容量}}{1\text{x}10^5\text{細胞/mL}} - \text{細胞容量}$$

3. 適切な細胞培養培地を含む新しい滅菌フラスコまたはプレートに、必要な数の細胞を再播種します。細胞を5% CO_2・37°C設定のインキュベーターに入れます。

Cas9およびdCas9 -VPR安定細胞株の凍結

1. トリプシン処理（付着細胞株の場合）し、1200 rpmまたは300xgで5分間細胞を遠心分離します。
2. 付録の表3に記載されているように、細胞ペレットを適切な凍結培地に再懸濁します。
3. 細胞懸濁液を適切なクライオバイアルに移します。
4. 凍結培地を添加してから5分以内に、必ずクライオバイアルを冷凍庫に移してください。ゆっくりと冷却できるように、-80°Cの冷凍庫内の適切な凍結容器にチューブを入れます。
5. 翌日、クライオバイアルを液体窒素に移します。

技術的なヒント：凍結して、継代数の少ない細胞を使用することを強くお勧めします。

ガイドRNAの導入

化学合成ガイドRNAの導入には、バックグラウンド細胞株に最適なトランスフェクション法を使用し、化学合成ポジティブおよびネガティブコントロールガイドRNAを使用して導入条件を最適化することをお勧めします。脂質ベースのトランスフェクション試薬でトランスフェクトできるバックグラウンド細胞株については、DharmaFECTトランスフェクション試薬の使用をお勧めします（推奨されるDharmaFECT試薬についてはTable 1を参照してください）。

DharmaFECT Formula	Names of Background Cell Lines
DharmaFECT 1	A549, RKO, NIH/3T3, HAP1
DharmaFECT 4	HCT-116, U2OS, MDA-MB-231

Table 1. Cas9およびdCas9-VPR安定細胞株に推奨されるDharmaFECTの種類

エレクトロポレーションによるガイドRNA導入に適したJurkatやK-562などのバックグラウンド細胞株については、エレクトロポレーション機器の製造元のプロトコールに従うことをお勧めします。

よくある質問（FAQ）

1. Cas9およびdCas9-VPR安定発現細胞株を培養する間、ブラストサイジン選択圧を維持する必要がありますか？

下流のアプリケーションによって異なります。

ブラストサイジン選択マーカーを備えたCas9またはdCas9-VPR発現コンストラクトは、レンチウイルス形質導入後に細胞ゲノムに組み込まれるため、単一の遺伝子編集または活性化実験ではブラストサイジン圧力を維持する必要はありません。

ただし、CRISPRまたはCRISPRaスクリーニングアッセイなどの特定のアプリケーションでは、Cas9またはdCas9-VPR発現の潜在的なサイレンシングを防ぐためにブラストサイジン選択圧を維持することが望ましい場合があります。この場合、ブラストサイジンはトランスフェクション中には除去し、トランスフェクションの2〜3日後に再添加します。各細胞株の推奨ブラストサイジン濃度については、Table 4を参照してください。

2. Cas9またはdCas9-VPRがCas9およびdCas9安定発現細胞株で発現しているかどうかはどうすればわかりますか？

品質管理では、Cas9およびdCas9-VPR活性は、化学合成されたポジティブおよびネガティブコントロールガイドRNAによる一過性トランスフェクション後、それぞれ順に機能的遺伝子編集およびRT-qPCRアッセイによって確認しています。

Cas9安定発現細胞株を使用する場合は、化学合成ガイドRNAポジティブコントロールキット（ミスマッチアッセイプライマーを含む）の1つを使用し、ミスマッチアッセイを実行して編集効率を評価し、ガイドRNAの導入条件を最適化することをお勧めします。遺伝子特異的ガイドRNAを使用して実験する際には、導入条件が最適化された後であっても、ミスマッチ検出アッセイも実行することもお勧めします。

dCas9-VPR安定細胞株を使用する場合は、化学合成CRISPRaポジティブcrRNAコントロールの1つを使用し、RT-qPCRを実行してガイドRNAの導入条件を最適化することをお勧めします。

3. 私のHAP1 Cas9/ dCas9-VPR安定発現細胞は丸く見え、解凍後にプレートから持ち上げられましたが、死んでいますか？

HAP1細胞は付着性ですが、細胞周期のS期に丸められて、フラスコから持ち上げられます。リバイバル後に半分の培地交換を行うと、活発に分裂している細胞の除去を回避するのに役立ちます。

4. 推奨される細胞密度を超えるとどうなりますか？

最大推奨密度を超えると、細胞の健康と生存率に影響します。細胞密度を超える場合、ベストプラクティスは新鮮なストックから始めることです。

Appendix

Cell culture medium and cell line maintenance tips

Cell culture medium and cell line maintenance tips can be found in Table 2.

Background cell line	Cat#	Basal medium	Supplements	Subculturing tips
A549	HD Cas9-001 HD dCas9-VPR-001	RPMI 1640	10% FBS 1% Pen/Strep	• Recommended split ratio - 1:3 to 1:8 • Maintain cultures between 6 x 10^3 - 6 x 10^4 cells/cm^2 • Cultures should not exceed 7 x 10^4 cells/cm^2
HCT-116	HD Cas9-002 HD dCas9-VPR-002	RPMI 1640	10% FBS 1% Pen/Strep	• Recommended split ratio - 1:3 to 1:8 • Split cultures at 75-90% confluency
Jurkat	HD Cas9-004	RPMI 1640	10% FBS 1% Pen/Strep	• Maintain cultures between 1 x 10^5 and 1 X 10^6 cells/mL
K-562	HD Cas9-005 HD dCas9-VPR-005	IMDM	10% FBS 1% Pen/Strep	• Maintain cultures between 1 x 10^5 and 1 X 10^6 cells/mL
RKO	HD Cas9-007	RPMI 1640	10% FBS 1% Pen/Strep	• Recommended split ratio - 1:3 to 1:12 • Split cultures at 75-90% confluency
NIH/3T3	HD Cas9-010	DMEM, high glucose, GlutaMAX™	10% FBS 1% Pen/Strep	• Seed 3-5 x 10^3 cells/cm^2 • Split cultures at 80% confluence or less • Do not allow the cultures to become confluent
HAP1	HD Cas9-011 HD dCas9-VPR-011	IMDM	10% FBS 1% Pen/Strep	• Recommended split ratio - 1: 10 to 1: 15 • Do not allow cells to be kept at high density, maximum density: 75% confluency
U2OS	HD Cas9-012 HD dCas9-VPR-012	DMEM, high glucose	10% FBS 1% Sodium Pyruvate 1% Pen/Strep	• Recommended split ratio - 1:3 to 1:6 • Split at 75-90% confluency
MDA-MB-231	HD Cas9-014 HD dCas9-VPR-014	DMEM/F-12	10% FBS 1% Pen/Strep	• Recommended split ratio - 1:2 to 1:4 • Split cultures at 75-90% confluency

Table 2. Cas9 and dCas9-VPR stable cell line culture medium

Abbreviation and catalog numbers:

FBS: Fetal Bovine Serum
Pen/Strep: Penicillin/Streptomycin
RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute Medium (Thermo Fisher, Cat. #21875-034)
DMEM/F-12: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (Thermo Fisher, Cat. #31330-038)
IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Thermo Fisher, Cat. #21980-032)
DMEM, high glucose: Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose (Thermo Fisher, Cat. #41965-039)
DMEM, high glucose, GlutaMAX™: Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose (Thermo Fisher, Cat. #61965-026)

Cas9およびdCas9-VPR安定発現細胞株に推奨される凍結培地

推奨される凍結培地は、表2に記載されている適切な基礎培地、50%FBS、および表3に記載されている適切な割合のDMSOで構成されています。

Freezing medium	Names of background cell lines
45% Basal Medium 50% FBS 5% DMSO	A549, HCT-116, RKO, NIH/3T3, HAP1, U2OS, and MDA-MB-231
40% Basal Medium 50% FBS 10% DMSO	Jurkat and K-562

Table 3. Cas9およびdCas9-VPR安定発現細胞株に推奨される凍結培地

Cas9およびdCas9-VPR安定発現細胞株に推奨される凍結培地

Cas9およびdCas9-VPR安定発現細胞株は、製造中に14日間ブラストサイジン選択されました。選択圧を再度適用したい場合は、Table 4の各細胞株のブラストサイジン濃度を参照してください。

Blasticidin concentration	Names of background cell lines
5 µg/mL	Jurkat, NIH/3T3
10 µg/mL	A549, HCT-116, K-562, RKO, U2OS, MDA-MB-231
15 µg/mL	HAP1

Table 4. 推奨されるブラストサイジン選択濃度

For more information

ホライゾン・ディスカバリー株式会社
horizondiscovery.com/contact-us

©2023 Horizon Discovery Group Ltd and its affiliated companies. All rights reserved. Revvity is a trademark of Revvity, Inc., registered in the United States and other countries. Horizon Discovery is a trademark of Horizon Discovery Ltd. Dharmacon is a trademark of Dharmacon, Inc. All Revvity, Inc., Horizon Discovery Ltd and Dharmacon, Inc. trademarks are used with permission. Other product names and brand names may be trademarks or registered trademarks of their respective owners.

本文書は英語版TECHNICAL MANUALを元にした日本語版です。内容は英語版の最新バージョンとは異なることがあります。

B058-2212-v2