

对CD34+ HSPCs进行 高效基因编辑

CellPore™ 细胞转染系统



CD34+造血干祖细胞 (HSPCs) 在再生造血系统方面发挥着至关重要的作用, 并具有治疗遗传性血液疾病和免疫疾病的巨大潜力。基因编辑技术, 尤其是CRISPR-Cas9, 为细胞的精准基因修饰打开了新大门。然而, 编辑效率低、脱靶效应、细胞毒性、递送效率低和干细胞特性丧失等问题仍亟需解决。

CellPore™转染系统可解决这些问题与挑战, 其能够对原代人CD34+ HSPCs中进行高效的基因编辑, 并同时保留细胞表型和功能。这种易操作的转染系统使用高压将一系列目标分子递送到难转染的细胞中, 并且将对细胞的干扰降至最低。与其他转染方法相比, CellPore™递送效率高且能够保持细胞的高活力, 只需对实验方案进行少量调整即可无缝融入至您当前的工作流程中。

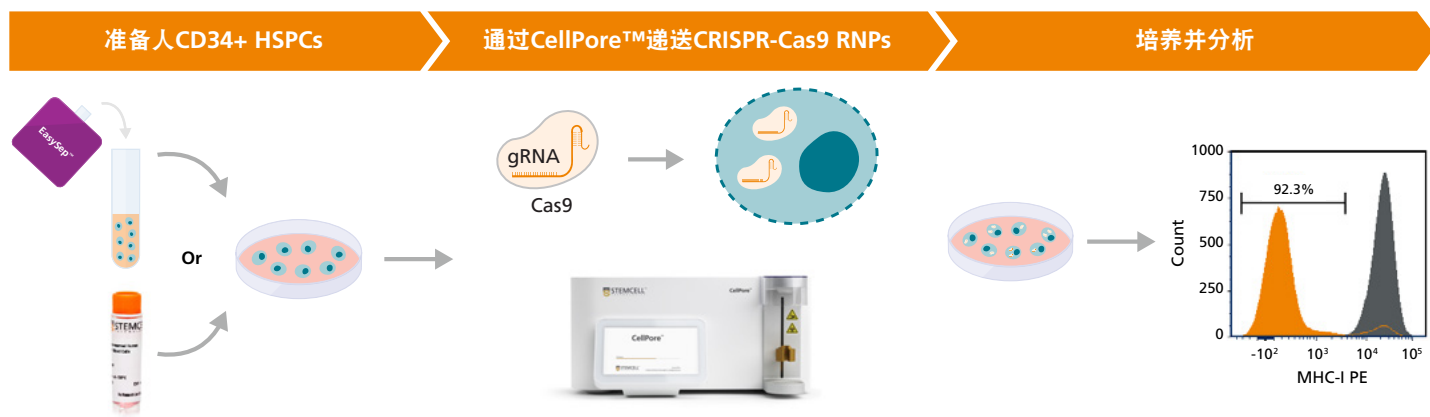


图1. 使用CellPore™转染系统对人CD34+ HSPCs进行基因编辑的实验工作流程

使用EasySep™从脐带血或动员外周血中分离人CD34+ HSPCs, 或复苏冻存的CD34+ HSPCs。使用含CD34+扩增添加物(可选择添加1μM UM729)的StemSpan™ SFEM II培养基培养4 - 24小时。通过将Cas9与靶向特定基因的sgRNA复合以制备CRISPR-Cas9核糖核蛋白(RNP)。收集细胞并使用CellPore™转染系统和CellPore™转染试剂盒300进行转染。递送完成后, 将细胞放回培养皿中继续培养, 并通过流式细胞术或T7核酸内切酶检测评估编辑效率。可通过体外CFU分析或使用定制的StemSpan™培养基和添加物进行谱系特异性分化来测试编辑后的祖细胞功能。

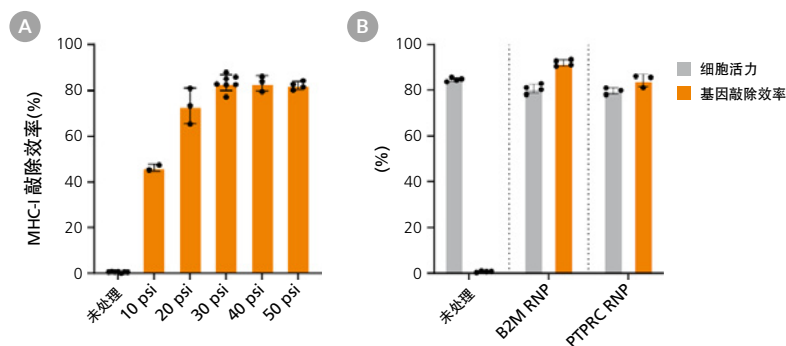


图2. CellPore™转染系统可高效地对CD34+ HSPCs进行基因敲除

复苏冻存的脐带血来源的CD34+ HSPCs并在添加了StemSpan™ CD34+扩增添加物和1μM UM729的StemSpan™ SFEM II培养基中培养24小时。使用CellPore™转染系统和CellPore™转染试剂盒300将靶向B2M或PTPRC基因的40 pmol RNP复合物 (Cas9:sgRNA为1:2.5) 递送至5x10⁴个HSPCs中 (80 μL反应体积)。使用流式细胞术评估转染四天后的活力和B2M (表面MHC-I标志物) 或PTPRC (表面CD45标志物) 的敲除效率。(A) 进行压力梯度测试以确定CD34+ HSPCs的最佳递送压力, 确定为30 psi。(B) 在30 psi下, B2M的平均敲除效率为91.8% ± 1.4, PTPRC的平均敲除效率为84.2% ± 2.7, 同时保持了高细胞活力。数据以平均值 ± 标准差表示 (n = 2 - 7)。

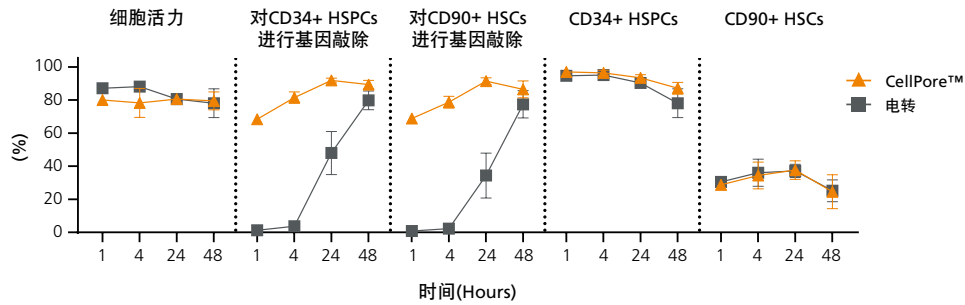


图3. CellPore™转染系统可实现对CD34+ HSPCs的早期基因编辑

靶向B2M的Cas9 RNP复合物 (80 μL反应体积, 在 5×10^4 个细胞中加40 pmol复合物, Cas9:sgRNA为1:2.5) 在30 psi下使用CellPore™转染系统或通过优化的电转方案递送至CD34+ HSPCs中, 转染前培养时间分别为1、4、24或48小时。转染四天后, 通过流式细胞术评估活力、B2M基因敲除效率以及CD45+CD34+ HSPC和初始CD34+CD45RA-CD90+ HSC亚群比例。CellPore™仅需4小时的转染前培养即可实现≥80%的基因敲除效率, 而电转需要48小时的培养才能实现一致的高编辑效率。这种缩短的CellPore™工作流程在维持大量CD34+ HSPC以及初始CD90+ HSC比例方面具有显著的优势。数据显示为平均值 ± 标准差 (n = 1 - 6)。

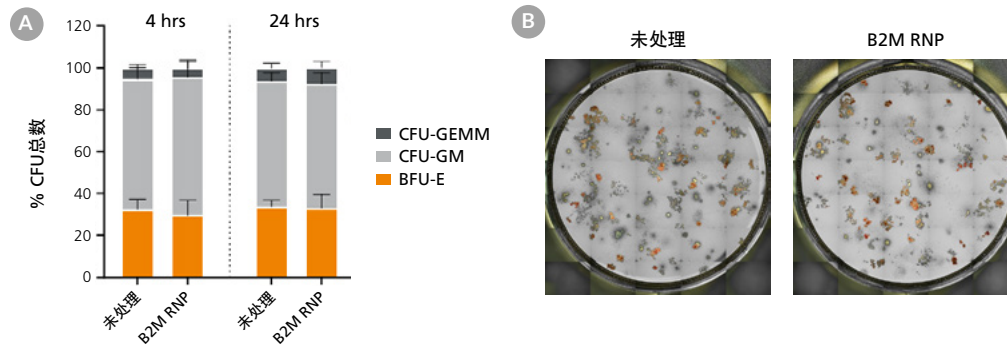


图4. CellPore™转染系统保留了CD34+ HSPCs的增殖和分化潜能

将CD34+ HSPCs预培养4或24小时, 然后使用CellPore™转染系统在30 psi下递送靶向B2M的Cas9 RNP复合物 (80 μL反应体积, 在 5×10^4 个细胞中加40 pmol复合物, Cas9:sgRNA为1:2.5)。转染24小时后, 将细胞分成三份接种在MethoCult™H4435富集培养基中并培养14天以进行CFU分析。(A) 集落亚型分布, (B) 集落大小, 与未处理的对照组相当。数据显示为平均值 ± 标准差 (n = 3 - 4)。

为什么使用CellPore™?

- 高性能。** 实现高转染效率并保持细胞高活力
- 易使用。** 只需调节单个参数即可确定最佳的转染条件
- 温和。** 在保证细胞质量的情况下将目的分子递送至细胞内
- 快速。** 每秒可转染高达1000万个细胞
- 灵活。** 可向多种细胞类型递送多种目的分子



查看实验方案

www.stemcell.com/cellpore-cd34



了解更多

www.cellpore.com



申请操作演示

www.stemcell.com/cellpore-demo

版权所有© 2024 STEMCELL Technologies Inc. 保留所有权利,包括图形和图像。STEMCELL Technologies & Design、STEMCELL Shield Design、Scientists Helping Scientists、CellPore、EasySep、MethoCult和 StemSpan是 STEMCELL Technologies Canada Inc.的商标。所有其他商标均归各自所有者所有。尽管STEMCELL已尽一切合理努力确保STEMCELL及供应商提供的信息正确无误,但不对此类信息的准确性或完整性作出任何保证或陈述。

除非另有说明,否则产品仅供研究使用,不适用于人或动物的诊断或治疗用途。有关产品特定的合规性和预期用途信息,请参阅产品说明书。有关STEMCELL质量的一般信息可在WWW.STEMCELL.COM/COMPLIANCE上查询。