

ProteanFect CRISPRMax Cas9 基因编辑 转染试剂盒使用说明书

产品简介

ProteanFect CRISPRMax Cas9 基因编辑转染试剂盒在 ProteanFect Max 系列产品中专门用于原代细胞与难转细胞系基因编辑。ProteanFect 基于自组装蛋白纳米颗粒，为一种非病毒、非电转、非脂质体的转染试剂。ProteanFect CRISPRMax Cas9 基因编辑转染试剂盒能够更高效且安全地将基因编辑工具递送至细胞内，进而实现高效的基因编辑。

试剂盒成分与储存说明

ProteanFect CRISPRMax Cas9 基因编辑转染试剂盒采用干冰运输，收货后需存放于推荐储存温度下直至使用。**试剂盒规格依据 Reagent B 的体积设定。**试剂盒内配备阳性对照样品，其中含有编码绿色荧光蛋白（EGFP）的 mRNA，可用于验证实验操作流程和转染效率；同时还有靶向人 *TRAC* 基因的 sgRNA，以此来检验实验操作以及试剂质量。开封后，为保障试剂性能处于最佳状态，各组分应依据表 1 所列存储条件妥善存放。

表 1 ProteanFect CRISPRMax Cas9 产品试剂盒组分

成分	存储方式
Reagent A (for CRISPR/Cas9)	打开使用后，保存于 2-8℃
Reagent B (for CRISPR/Cas9)	保存于-20℃，避免反复冻融
Reagent C (for CRISPR/Cas9)	打开使用后，保存于 2-8℃
Cas9 mRNA (1 µg/µL)	保存于-80℃，避免反复冻融
EGFP mRNA (1 µg/µL) 阳性对照	保存于-80℃，避免反复冻融
Human <i>TRAC</i> -sgRNA (1 µg/µL) 阳性对照 ^a	保存于-80℃，避免反复冻融

a, human *TRAC*-sgRNA 的靶向序列为 TGTGCTAGACATGAGGTCTA。

实验前材料准备

- 待转染细胞：转染前细胞必须处于良好的生长状态，活率 > 90%；对于原代细胞，建议在适当活化后进行转染。详细操作可参考微信公众号“西湖凝聚体”中的转染攻略。
- 推荐培养基：Opti-MEM 培养基（或无血清的 RPMI 1640 培养基/无血清 DMEM 培养基），提前预热或恢复至室温。
- 其他：完全培养基，无菌 EP 管、所需转染的核酸样品

ProteanFect CRISPRMax Cas9 基因编辑 转染试剂盒使用说明书

表 2 ProteanFect CRISPRMax Cas9 转染不同类型细胞的实验操作步骤说明（以 96 孔板体系为例）

操作步骤	细胞系转染	原代细胞转染 ^a
1 配置 ProteanFect 转染体系		
1.1 将 Reagent A (for CRISPR/Cas9) 与 mRNA 混合	在 40 μ L Reagent A (for CRISPR/Cas9) 中加入 0.25 μ g Cas9 mRNA 和 0.25 μ g sgRNA，充分混匀（Reagent A 使用前需颠倒混匀）	在 40 μ L Reagent A (for CRISPR/Cas9) 中加入 0.25 μ g Cas9 mRNA 和 0.25 μ g sgRNA，充分混匀（Reagent A 使用前需颠倒混匀）
1.2 加入 Reagent B (for CRISPR/Cas9) 轻柔充分混匀	往上述混合物中加入 1.4 μ L Reagent B (for CRISPR/Cas9) 混匀 ^b	往上述混合物中加入 0.7 μ L Reagent B (for CRISPR/Cas9) 混匀 ^b
1.3 加入 Reagent C (for CRISPR/Cas9) 混匀	N/A	往上述混合物中加入 13.5 μ L Reagent C (for CRISPR/Cas9) 混匀
2 细胞处理（转染液制备完成后再准备待转细胞）		
2.1 悬浮细胞准备（尽量去除 FBS，以免影响转染效果）	取待转染细胞，300 g 离心 5 分钟，收集细胞沉淀，去上清，加入 Opti-MEM（提前预热或恢复至室温）重悬并洗涤，调至 $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ cells/mL 备用	取待转染细胞，300 g 离心 5 分钟，收集细胞沉淀，去上清，加入 Opti-MEM（提前预热或恢复至室温）重悬并洗涤，调至 $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ cells/mL 备用
2.2 贴壁细胞准备（尽量去除 FBS，以免影响转染效果）	转染前汇合率应保持在 50%-80%；弃去培养基后，用 Opti-MEM（提前预热或恢复至室温）轻柔清洗细胞两次，并加入 20 μ L Opti-MEM 备用	转染前汇合率应保持在 50%-80%；弃去培养基后，用 Opti-MEM（提前预热或恢复至室温）轻柔清洗细胞两次，并加入 20 μ L Opti-MEM 备用
3 细胞转染		
3.1 混合转染体系与细胞	将上述配置好的 ProteanFect 转染体系与 20 μ L 细胞悬液（可直接在离心管中孵育）或贴壁细胞混合均匀	将上述配置好的 ProteanFect 转染体系与 20 μ L 细胞悬液（可直接在离心管中孵育）或贴壁细胞混合均匀
3.2 孵育	37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 45-60 分钟 ^c	37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 15 分钟 ^c
3.3 终止反应与洗涤	加入至少 200 μ L 完全培养基，300 g 离心 5 分钟，弃上清（为避免细胞损失，无需完全弃尽）；对于贴壁细胞，直接弃去混合液，补加培养基	加入至少 200 μ L 完全培养基，300 g 离心 5 分钟，弃上清（为避免细胞损失，无需完全弃尽）；对于贴壁细胞，直接弃去混合液，补加培养基
3.4 细胞培养与观察	加入适量完全培养基，进行细胞培养，72 小时后可对靶点进行编辑效率分析 ^d	加入适量完全培养基，进行细胞培养，72 小时后可对靶点进行编辑效率分析 ^d

a, 对于原代细胞，建议在转染前进行适当的活化处理，以提高转染效果。例如，人原代 T 细胞可使用激活磁珠或抗体激活 2-10 天。

b, ProteanFect 转染体系在配置过程中可能会出现一定的粘稠现象，属于正常情况。

c, 孵育时间可根据不同细胞类型有所调整。建议细胞系的孵育时间不超过 2 小时，原代细胞孵育时间不超过 30 分钟。

d, EGFP mRNA 阳性对照可用于转染效率检测，具体操作方法为，1.1 在 40 μ L Reagent A (for CRISPR/Cas9) 中加入 0.5 μ g EGFP mRNA 充分混匀，其它步骤同表 2。可在转染后 5-48 小时内观察到 EGFP 的表达，24 小时流式检测阳性率。

ProteanFect CRISPRMax Cas9 基因编辑 转染试剂盒使用说明书

表 3 ProteanFect CRISPRMax Cas9 转染不同细胞培养孔板规格的各组分使用含量

* 大体系转染推荐使用离心管孵育

组分	孔板类型	细胞系	原代细胞
Reagent A (for CRISPR/Cas9)	96 孔	40 μ L	
	48 孔	80 μ L	
	24 孔	200 μ L	
	12 孔	600 μ L	
	6 孔	800 μ L	
Cas9 mRNA/sgRNA	96 孔	0.25 μ g/0.25 μ g	
	48 孔	0.5 μ g/0.5 μ g	
	24 孔	1.25 μ g/1.25 μ g	
	12 孔	3.75 μ g/3.75 μ g	
	6 孔	5 μ g/5 μ g	
Reagent B (for CRISPR/Cas9)	96 孔	1.4 μ L	0.7 μ L
	48 孔	2.8 μ L	1.4 μ L
	24 孔	7 μ L	3.5 μ L
	12 孔	21 μ L	10.5 μ L
	6 孔	28 μ L	14 μ L
Reagent C (for CRISPR/Cas9)	96 孔	NA	13.5 μ L
	48 孔		27 μ L
	24 孔		67 μ L
	12 孔		202 μ L
	6 孔		270 μ L
推荐每孔细胞数 (Opti-MEM)	96 孔	$1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ (20 μ L)	
	48 孔	$2 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$ (40 μ L)	
	24 孔	$5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ (100 μ L)	
	12 孔	$1.5 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ (300 μ L)	
	6 孔	$2 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ (400 μ L)	

ProteanFect CRISPRMax Cas9 基因编辑 转染试剂盒使用说明书

数据分享

使用 ProteanFect CRISPRMax Cas9 基因编辑转染试剂盒转染人原代 T 细胞，使用试剂盒中的 human *TRAC*-sgRNA 阳性对照敲除 *TRAC* 基因。在转染 72 小时后，收集细胞，在蛋白水平（图 1）和 DNA 水平（图 2）检测基因敲除的效率。

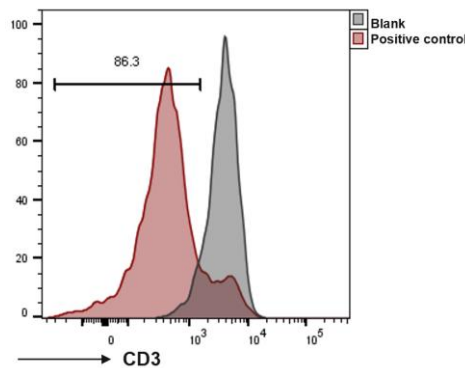


图 1. 使用 ProteanFect CRISPRMax Cas9 基因编辑转染试剂盒编辑人原代 T 细胞中 *TRAC* 基因后，TCR 蛋白表达的流式检测结果。流式结果显示，阳性对照组中约 86% 的 T 细胞为 CD3 阴性，表明该试剂盒同时递送 Cas9 mRNA/sgRNA，总细胞群中约有 86% 细胞的 *TRAC* 基因被成功编辑。

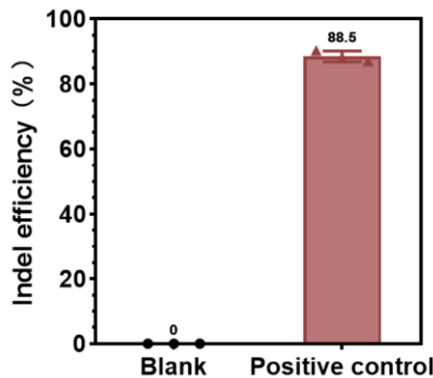


图 2. 使用 ProteanFect CRISPRMax Cas9 基因编辑转染试剂盒编辑人原代 T 细胞中 *TRAC* 基因的测序分析结果。收集转染后的总细胞提取基因组 DNA，对靶点位置 PCR 扩增（正向引物序列：GCAGTATTATTAAGTAGCCCT，反向引物序列：ACAAGGCTCACTGTTTCTT）并进行 Sanger 测序，通过 TIDE 对测序结果进行分析，结果显示阳性对照组中靶点基因被编辑的比例约为 88.5%，与流式检测蛋白水平的敲除结果（CD3-TCR 流式阴性比例）相当。

ProteanFect CRISPRMax Cas9 基因编辑 转染试剂盒使用说明书

常见问题

1. 如何提升转染效率

转染条件需根据细胞类型和培养条件进行优化。建议：**1) 延长转染时间**：根据细胞状态适当延长转染时间。通常原代细胞不超过 30 分钟，细胞系不超过 2 小时。**2) 提升 ProteanFect 转染量**：适当增加转染体系至初始的 1.5-2.5 倍。

2. 细胞系转染前处理

1) 为获得良好的转染效率，建议使用活性超过 90% 的细胞，可以通过台盼蓝染色测定细胞活性。2) 不建议使用传代次数超过 15 次的细胞进行实验。3) 新复苏的细胞在转染实验前需传代 2-3 次，待细胞恢复正常生长后使用。

3. 原代细胞转染前预处理

对于原代细胞，充分活化有助于提高转染效率，因此建议在适当活化后进行转染。例如，人原代 T 细胞可使用 CD3/CD28 磁珠或抗体进行激活，激活 2-10 天内均可转染，其中激活 4-6 天时转染效率最高。（详细操作和技巧可参考微信公众号“西湖凝聚体”中的转染攻略→人原代 T）。

4. 关于试剂盒中 EGFP mRNA 阳性对照的使用建议

首次尝试时，建议设置阳性对照组（EGFP mRNA），以检测实验操作和试剂的有效性。为节省细胞和试剂，使用 96 孔板的细胞量即可，转染体系中 EGFP mRNA 的用量为 0.5 μg 。

5. 如何指示 Cas9 mRNA 转染效率

ProteanFect 具有较高的核酸加载量，可同时转染多个核酸，不会影响转染效率，且共表达率为 90% 以上。因此我们推荐将 EGFP mRNA 和 Cas9 mRNA / sgRNA 共转。推荐使用量，以 96 孔细胞数为例，0.2 μg Cas9 mRNA、0.2 μg sgRNA、0.1 μg EGFP mRNA，EGFP 的阳性率可以指示转染效率。

6. 转染时的细胞数范围

ProteanFect CRISPRMax Cas9 基因编辑 转染试剂盒使用说明书

说明书中提供了最佳转染条件下的细胞数量范围,但在特殊情况下,即使细胞数量较少,也可以进行转染。以 96 孔板为例,建议细胞数量不低于 4×10^3 /孔,以确保后续检测的可靠性。

7. 转染后细胞状态与活力

转染后,细胞状态可能与未处理组略有差异。但使用 ProteanFect 试剂进行转染时,对细胞活力的损伤较小。通常在转染后第二天,细胞状态会基本恢复。

8. 转染后细胞离心后看不到沉淀

对于小体积转染体系(如 96 孔板),离心后细胞沉淀不明显是正常现象。细胞沉淀可能散落在离心管侧壁,不影响后续结果。为减少细胞损失,离心后移液时应避免枪头紧贴底部。

9. 转染体系扩大是否影响转染效率

如转染细胞量较大,推荐使用离心管进行孵育,转染体系参照表 3,不会影响转染效率。

10. 贴壁细胞如何转染

对于贴壁细胞,可提前一天种板后进行转染,也可消化成细胞悬液进行悬浮转染。具体操作参照表 2。

如果您在实验过程中遇到任何问题,欢迎通过扫描下方二维码联系我们的技术微信,或将您的问题发送至我们的电子邮件: proteanfect@nanoportalbio.com。我们的专业团队将竭诚为您解答疑问,提供技术支持。

