

ProteanFect CRISPR Max Cas9 小鼠原代免疫细胞基因编辑试剂盒小鼠原代 T 细胞中基因敲除操作攻略

随着免疫学领域研究的不断深入,越来越多的研究工作需在免疫功能健全的动物上开展,如 CAR - T 细胞疗法、自身免疫性疾病相关研究等。这种趋势使得对小鼠原代免疫细胞基因编辑的需求大幅增加,相应地,也给递送技术带来了更为严峻的挑战。当前,CRISPR/Cas9 技术已然成为一种较为成熟的 DNA 编辑工具。ProteanFect CRISPRMax Cas9 小鼠原代免疫细胞基因编辑试剂盒能够高效、低毒且便捷地把 Cas9 mRNA 和 sgRNA 同时输送至小鼠原代免疫细胞中,从而实现对基因组的改造。本文将详细阐述使用 ProteanFect CRISPRMax Cas9 小鼠原代免疫细胞基因编辑试剂盒在小鼠原代 T 细胞进行基因敲除的方法。

实验前准备

小鼠原代 T 细胞: 合适的培养条件和激活方法对细胞的成功转染非常关键。**T 细胞转染前**需要充分活化,以实现较高的转染效率。

ProteanFect CRISPRMax Cas9 小鼠原代免疫细胞基因编辑试剂盒: 包含 Reagent A (for Mouse Immunocytes), Reagent B (for Mouse Immunocytes), Reagent C (for Mouse Immunocytes), Cas9 mRNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), EGFP mRNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 阳性对照, mouse *Trac*-sgRNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 阳性对照。

sgRNA: 化学合成或体外转录。

小鼠原代 T 细胞的分离与活化

T 细胞的分离: 以来自小鼠脾脏白细胞开始,可以使用市面上阴性选择或者阳性选择分离得到 T 细胞亚群(包括 CD3^+ T 细胞、 CD4^+ T 细胞或 CD8^+ T 细胞或调节性 T 细胞)。

T 细胞的活化:

磁珠激活: $\text{CD3}/\text{CD28}$ 激活磁珠能够提供 T 细胞激活与扩增所需的主要和协同刺激信号,显著提高 T 细胞的活化和扩增效率。

抗体激活: 使用 $\text{CD3}/\text{CD28}$ 抗体刺激 T 细胞,模拟 T 细胞活化的双信号作用,也是进行 T 细胞激活与扩增应用广泛的方法。

小鼠原代 T 细胞的培养与传代

1. T 细胞培养与激活过程中,建议在培养基中添加人重组 IL-2,以刺激 T 细胞群的扩增。IL-2 的使用浓度为 300 IU/mL。
2. 建议每 2 天对 T 细胞进行传代。
3. 推荐在 T 细胞激活后 2-4 天进行转染。如果细胞激活与传代时间过长,转染后的细胞活力与转染效率可能会降低。

使用 ProteanFect CRISPRMax Cas9 小鼠原代免疫细胞基因编辑试剂盒对小鼠原代 T 细胞进行基因编辑

- 1. 适合转染的培养基：使用 Opti-MEM 培养基（37℃提前预热或恢复至室温）进行转染。
- 2. 配置转染体系：配置前如观察到 Reagent C (for Mouse Immunocytes) 溶液有析出，室温或加热（65℃水浴）至完全溶解后使用。具体详见表 1-表 2。由于 T 细胞对环境敏感，建议在转染液配置完成后再处理细胞（若细胞处理时间过长，建议将配置好的转染液暂放于四度冰箱或冰上，以免影响转染效率）。转染体系在配置过程中出现粘稠现象属于正常。
- 3. 转染前细胞准备：转染体系制备完再准备待转细胞，并确保细胞处于良好生长状态，活率在 90%以上。调整细胞转染密度时，避免反复离心，以免延长处理时间，影响细胞活力和转染效率。
- 4. 细胞转染：建议孵育时间为 15-30 分钟，延长时间可能影响细胞活力。
- 5. 编辑效率检测：转染 72h 后可对编辑效率进行检测。提取基因组 DNA，对靶点位置进行 PCR 测序，分析编辑效率。

表 1. ProteanFect CRISPRMax Cas9 小鼠原代免疫细胞基因编辑试剂盒转染小鼠原代 T 细胞实验操作步骤说明（以 96 孔板为例）

操作步骤	小鼠原代 T 细胞转染
1 配置转染体系	
1.1 将 Reagent A (for Mouse Immunocytes)与 RNA 混合	在 40 μL Reagent A (for Mouse Immunocytes)中加入 0.25 μg Cas9 mRNA 和 0.25 μg sgRNA，充分混匀
1.2 加入 Reagent B (for Mouse Immunocytes)	往上述混合物中加入 0.7 μL Reagent B (for Mouse Immunocytes)，混匀
1.3 加入 Reagent C (for Mouse Immunocytes)	往上述混合物中加入 4.5 μL Reagent C (for Mouse Immunocytes)，混匀
2 细胞处理（转染体系制备完再准备待转细胞）	
2.1 小鼠原代 T 细胞准备（尽量去除 FBS，以免影响转染效果）	取待转染小鼠原代 T 细胞，300 g 离心 5 分钟，去上清，收集细胞沉淀，加入 Opti-MEM（提前预热或恢复至室温）重悬并洗涤一次，细胞悬液调至 $1\times10^7-1.5\times10^7$ cells/mL 备用
3 细胞转染	
3.1 混合转染体系与细胞	将步骤 1.3 中制备的转染混合液与 20 μL 细胞悬液混合均匀（可直接在离心管中孵育）
3.2 孵育	37℃培养箱孵育 15-30 分钟
3.3 终止反应与洗涤	加入至少 200 μL 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）
3.4 细胞培养与检测	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

表 2.转染不同细胞培养孔板规格的各组分使用量

*大体系转染推荐使用离心管孵育

组分	孔板类型	加样量
Reagent A (for Mouse Immunocytes)	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 Mouse Immunocytes)	96 孔	0.7 μ L
	48 孔	1.4 μ L
	24 孔	3.5 μ L
	12 孔	10.5 μ L
	6 孔	14 μ L
Reagent C (for Mouse Immunocytes)	96 孔	4.5 μ L
	48 孔	9 μ L
	24 孔	22.5 μ L
	12 孔	67.5 μ L
	6 孔	90 μ L
推荐每孔细胞数（Opti-MEM）	96 孔	$2\times 10^5\sim 3\times 10^5$ （20 μ L）
	48 孔	$4\times 10^5\sim 6\times 10^5$ （40 μ L）
	24 孔	$1\times 10^6\sim 1.5\times 10^6$ （100 μ L）
	12 孔	$3\times 10^6\sim 4.5\times 10^6$ （300 μ L）
	6 孔	$4\times 10^6\sim 6\times 10^6$ （400 μ L）

使用 ProteanFect CRISPRMax Cas9 小鼠原代免疫细胞基因编辑试剂盒在小鼠原代 T 细胞中进行 *Trac* 基因敲除实例

特别提示：本文所提及的品牌货号仅供参考，用户可根据实验需求进行选择。

(1) 实验前准备

本实验 T 细胞培养的培养基成分如表 3 所示。

表 3. 小鼠原代 T 细胞培养培养基成分

成分	品牌货号
X-VIVO™ 15 培养基	Lonza, 04-418Q
FBS, 10%	Gibco™, 10099141C
注射用人白介素 2, 300 IU/mL	/
青霉素-链霉素-新霉素 (PSN) 抗生素混合物 (可选)	Gibco™, 15640055

(2) 分离与活化

本实验所用细胞分离试剂盒为 EasySep™ Mouse T Cell Isolation Kit (Stem Cell, 19851)，具体实验操作参考其官方说明书。采用抗体激活的方法，抗体信息为 anti-mouse CD3 (Invivo Mab, BE0002)，anti-mouse CD28 (Invivo Mab, BE0015-1)。具体操作步骤如下：

抗体包被：在 24 孔板中，用 PBS 润洗两次后，加入抗体稀释液（1:1000，anti-mouse CD3/CD28 抗体稀释于 PBS 中，稀释后对应的抗体浓度为 anti-mouse CD3: 8.42 µg/mL，anti-mouse CD28: 9.06 µg/mL），每孔 400-500 µL，置于 37° C 放置 5 小时。

细胞活化：小鼠脾脏中分选出的 T 细胞用完全培养基重悬，调整细胞密度至 2×10^6 /mL。取出包被好的 24 孔板，弃去包被液，每孔加入 1 mL T 细胞悬液，继续培养充分激活 T 细胞。

(3) 培养与传代

细胞在上述培养基中，抗体激活至第 2 天进行转染。激活和未激活小鼠原代 T 细胞形态如图 1 所示。

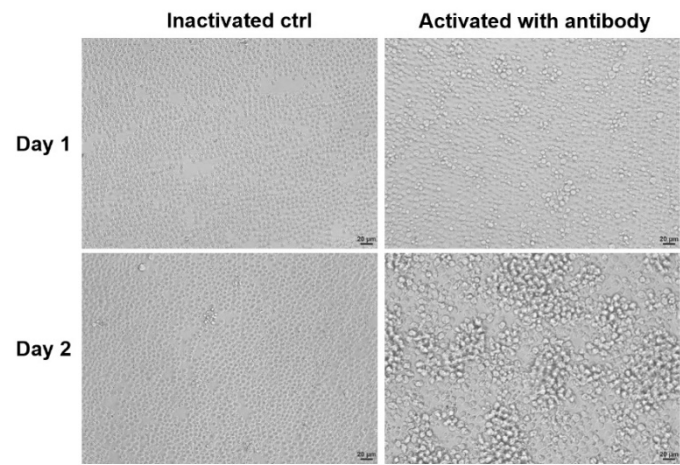


图 1. 小鼠原代 T 细胞未激活和经抗体激活后的细胞明场图。激活 2 天后的小鼠原代 T 细胞通常会比未激活的细胞更大，且已经开始形成细胞团块。

(4) 细胞转染（24 孔）

本次实验采用的 sgRNA 为试剂盒中 mouse *Trac*-sgRNA（靶向序列：TATGGATTCCAAGAGCAATG）阳性对照。

转染方案(由于 ProteanFect 系列试剂盒可高效共转多个基因,因此在本次实验中共转 EGFP mRNA 用于检测 Cas9 mRNA/sgRNA 的转染效率)

Cas9 mRNA	1 μg
SgRNA	1 μg
EGFP mRNA	0.5 μg
Reagent A (for Mouse Immunocytes)	200 μL
Reagent B (for Mouse Immunocytes)	3.5 μL
Reagent C (for Mouse Immunocytes)	22.5 μL
细胞数	1×10 ⁶

具体转染步骤参照表 1。

(5) 编辑效率分析

蛋白水平检测：

在转染 72h 后，收集约 1×10⁶ 个细胞，加入 1 mL PBS，300 g 离心 5 分钟，去上清，收集细胞沉淀，加入 50 μL 配置好的 CD3-TCR 抗体（Biogend，Cat. 100236，1:100 用 PBS 配置），室温孵育 15 min，加入 1 mL PBS，300 g 离心 5 分钟，去上清，加入 50 μL PBS 重悬细胞后进行流式检测（图 2）。

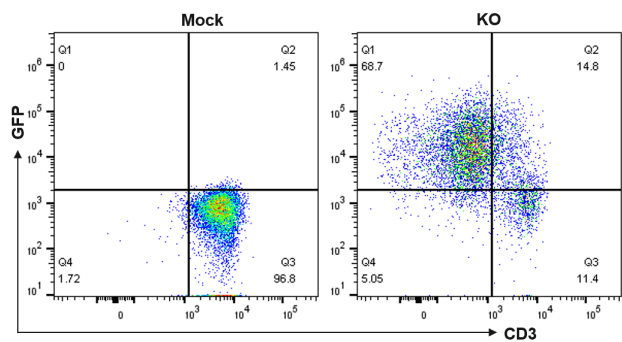


图 2. 使用 ProteanFect CRISPRMax Cas9 小鼠原代免疫细胞基因编辑试剂盒对小鼠原代 T 细胞进行 *Trac* 基因敲除的流式分析结果。流式结果显示，KO 组中约 73% 的 T 细胞为 CD3 阴性，表明 *Trac* 基因敲除的效率较高。同时，CD3 阴性和 EGFP 阳性信号具有较高相关性，表明 EGFP mRNA 与 Cas9 mRNA/sgRNA 共转的表达一致性良好，即 EGFP 可以作为筛选基因，方便后续筛选成功基因编辑的细胞。

DNA 水平检测：

在转染 72h 后，收集约 1×10^5 个细胞 300 g 离心 5 分钟，去上清，收集细胞提取 DNA，对靶点位置 PCR 扩增（正向引物序列：CACTGGCATCTGAGTTCTGA，反向引物序列：TGTCATGTTCTCTTGTCTGC）并进行 Sanger 测序，通过 TIDE 网站（[TIDE: Tracking of Indels by DEcomposition](https://tide.dfci.harvard.edu/)）对测序结果进行分析（图 3）。

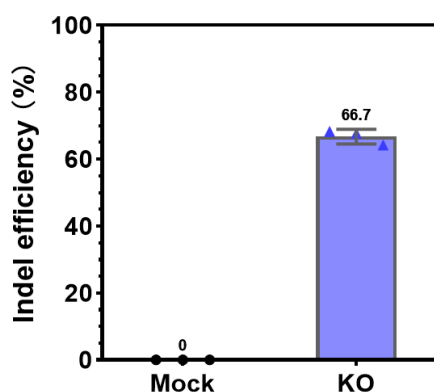


图 3. 小鼠原代 T 细胞中 *Trac* 基因敲除 DNA 水平分析结果。利用 ProteanFect CRISPRMax Cas9 小鼠原代免疫细胞基因编辑试剂盒，对基因 *Trac* 位点的编辑效率可达 66.7%，与流式检测蛋白水平的敲除结果（CD3-TCR 流式阴性比例）一致。

常见问题

1. 如何选择转染时间

ProteanFect Max 系列转染原代细胞的摄入过程迅速，一般在 15-30 分钟即可完成。可以分别转染 15 分钟和 30 分钟，综合考虑细胞活率和转染效率，选择合适的转染时间。

2. 质粒 DNA 能否用于原代细胞转染

双链 DNA 转染原代 T 细胞可能会引起一定的毒性，例如炎症应激等，因此需根据实验目的谨慎选择。

3. 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 。

4. 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。共转数据参考实例中的图 2。

5. 转染时的细胞数范围

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 2，不会影响转染效率。

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。

