

产品简介

ProteanFect CRISPRMax 转染试剂盒是 ProteanFect Max 系列中的一款专为小鼠原代免疫细胞基因编辑而设计的产品。该试剂盒基于自组装蛋白纳米颗粒,采用非病毒、非电转、非脂质体的转染方式,能够更高效且安全地将基因编辑工具递送至小鼠原代免疫细胞内,进而实现高效的基因编辑。

试剂盒储存与成分说明

ProteanFect CRISPRMax 小鼠原代免疫细胞转染试剂盒采用干冰运输,收到后应存放于 -80℃,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;同时还有靶向小鼠 *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 (PT06) 产品试剂盒组分

成分	存储方式
Reagent A (PT06)	打开使用后,保存于 2-8℃
Reagent B (PT06)	保存于-20℃,避免反复冻融
Reagent C (PT06)	如有析出,65℃水浴完全溶解后使用; 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
Mouse <i>Trac</i> -sgRNA (1 µg/µL) 阳性对照 ^a	保存于-80℃,避免反复冻融

a, Mouse *Trac*-sgRNA 的靶向序列为 TATGGATTCCAAGAGCAATG。

实验前材料准备

- 待转染细胞:小鼠原代免疫细胞应在一定条件下激活后进行转染,以确保最佳转染效率和细胞活力。若激活不充分或传代时间过长,可能导致细胞状态下降,影响转染效果。
- 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。
- 转染试剂:室温自然解冻,颠倒或涡旋至溶液均一后使用。如观察到 Reagent C(PT06)溶液有析出,65℃水浴至完全溶解后使用。
- 其他:完全培养基,无菌 EP 管、所需转染的核酸样品。

表 2 ProteanFect CRISPRMax (PT06) 小鼠原代免疫细胞转染试剂盒的实验操作步骤说明 (以 96 孔板体系为例)

* 配置前如观察到 Reagent C (PT06) 溶液有晶体析出, 65°C 水浴至完全溶解后使用

操作步骤	小鼠原代免疫细胞转染 ^a
1 配置 ProteanFect 转染体系 (配置完置于冰上)	
1.1 混合 Reagent A (PT06) 与 mRNA	在 40 μ L Reagent A (PT06) 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 (PT06) 并混匀	向上述混合液中加入 0.7 μ L Reagent B (PT06), 使用移液枪上下吹打 20 - 30 次或涡旋混匀 10 秒, 使其充分混合 ^b
1.3 加入 Reagent C (PT06) 混匀	往上述混合物中加入 10 μ L Reagent C (PT06) 并混匀
2 细胞处理 (尽量去除 FBS, 以免影响转染效果)	
2.1 小鼠原代免疫细胞准备	取待转染细胞, 300 g 离心 5 分钟, 弃去上清后以 Opti-MEM 重悬细胞沉淀, 再次离心。最终用 Opti-MEM 重悬并调整细胞浓度至 $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ cells/mL 备用
3 细胞转染	
3.1 混合转染体系与细胞	将配置好的 ProteanFect 转染体系与 20 μ L 细胞悬液混合后, 在离心管中孵育
3.2 孵育	37°C 培养箱孵育 15-30 分钟
3.3 终止反应与洗涤	加入约 5 倍转染体系体积 (250 μ L) 的完全培养基, 300 g 离心 5 分钟, 弃去上清 (可保留少量液体以减少细胞损失)
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 ^c

a, 小鼠原代免疫细胞应在适当激活后再进行转染。

b, 在配置 ProteanFect 转染体系过程中, 如出现轻微粘稠现象, 属正常现象。体系配置完成后建议置于冰上保存; 如需在室温下保存, 须在 30 分钟内使用完毕。

c, EGFP mRNA 阳性对照可用于转染效率检测, 具体操作如下: 1.1 在 40 μ L Reagent A (PT04) 中加入 0.5 μ g EGFP mRNA, 充分混匀, 其余步骤同表 2; 可在转染后 5 - 48 小时内可观察 EGFP 表达。

表 3 ProteanFect Max（PT06）小鼠原代免疫细胞转染试剂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，600 μL 体系（含 600 μL）以上涡旋混匀

组分	孔板类型	小鼠原代 T 细胞
Reagent A（PT06）	96 孔	40 μL
	48 孔	80 μL
	24 孔	200 μL
	12 孔	600 μL
	6 孔	800 μL
Cas9 mRNA/sgRNA	96 孔	0.25 μg/0.25 μg
	48 孔	0.5 μg/0.5 μg
	24 孔	1.25 μg/1.25 μg
	12 孔	3.75 μg/3.75 μg
	6 孔	5 μg/5 μg
Reagent B（PT06）	96 孔	0.7 μL
	48 孔	1.4 μL
	24 孔	3.5 μL
	12 孔	10.5 μL
	6 孔	14 μL
Reagent C（PT06）	96 孔	10 μL
	48 孔	20 μL
	24 孔	50 μL
	12 孔	150 μL
	6 孔	200 μL
推荐每孔细胞数（Opti-MEM）	96 孔	2×10 ⁵ ~3×10 ⁵ （20 μL）
	48 孔	4×10 ⁵ ~6×10 ⁵ （40 μL）
	24 孔	1×10 ⁶ ~1.5×10 ⁶ （100 μL）
	12 孔	3×10 ⁶ ~4.5×10 ⁶ （300 μL）
	6 孔	4×10 ⁶ ~6×10 ⁶ （400 μL）

数据分享

ProteanFect CRISPRMax 小鼠原代免疫细胞转染试剂盒转染小鼠原代 T 细胞，使用试剂盒中的 mouse *Trac*-sgRNA 阳性对照敲除小鼠 *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。

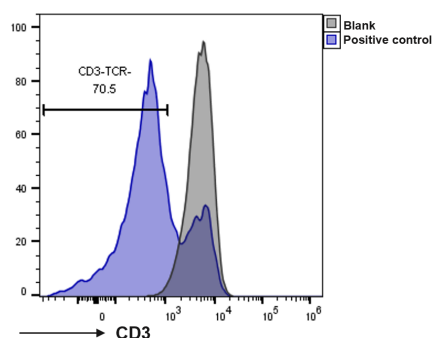


图 1. ProteanFect CRISPRMax (PT06) 小鼠原代免疫细胞转染试剂盒敲编辑小鼠原代 T 细胞中 *Trac* 基因后，TCR 蛋白表达的流式检测结果。流式结果显示，阳性对照组中约 70% 的 T 细胞为 CD3 阴性，表明该试剂盒同时递送 Cas9 mRNA/sgRNA，总细胞群中约有 70% 细胞的 *Trac* 基因被成功编辑。

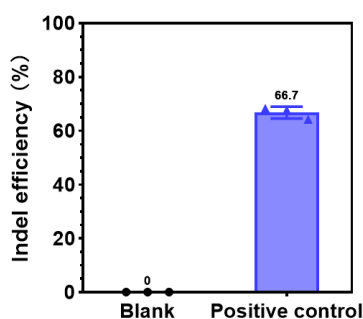


图 2. ProteanFect CRISPRMax (PT06) 小鼠原代免疫细胞转染试剂盒编辑小鼠原代 T 细胞中 *Trac* 基因的测序分析结果。收集转染后的总细胞提取基因组 DNA，对靶点位置 PCR 扩增（正向引物序列：CACTGGCATCTGAGTTCTGA，反向引物序列：TGTCATGTTCTCTTGTCTGC）并进行 Sanger 测序，通过 TIDE 对测序结果进行分析，结果显示阳性对照组中靶点基因被编辑的比例约为 66.7%，与流式检测蛋白水平的敲除结果（CD3-TCR 流式阴性比例）相当。

常见问题

1. 如何选择转染孵育时间

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. 原代 T 细胞转染前预处理

小鼠原代 T 细胞可使用 CD3/CD28 磁珠或抗体进行激活，充分激活 2-4 天内均可转染。可根据实验结果选择最佳转染时间。未激活或激活不佳的小鼠原代 T 细胞转染效率较低。（详细操作和技巧可参考微信公众号“西湖凝聚体”中的染攻略→CRISPR）。

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。使用 96 孔板的细胞量即可，节省细胞和试剂。具体操作见表 2 图注。

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 μ g Cas9 mRNA、0.2 μ g sgRNA、0.1 μ g EGFP mRNA，EGFP 的阳性率可以指示转染效率。

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。

6. 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。

7. 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。

8. 转染体系扩大是否影响转染效率

如转染细胞量较大，12 孔板体系及以上推荐在凝聚体配置步骤中采用涡旋方式混匀，在离心管进行孵育，转染体系参照表 3，不会影响转染效率。

9. 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。

10. 转染多个 gRNA

建议 sgRNA 浓度 $\geq 1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。如在 96 孔板体系同时转染多个 sgRNA，为确保高效的转染效果，加入的 sgRNA 总量为 $0.25 \mu\text{g}$ 。

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：tech@nanoportalbio.com。我们的专业团队将竭诚为您解答疑问，提供技术支持。

