

产品简介

ProteanFect CRISPRMax 转染试剂盒是 ProteanFect Max 系列中专为原代细胞和难转染细胞系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细胞内,从而实现高效的基因编辑。

试剂盒成分与储存说明

ProteanFect CRISPRMax 转染试剂盒采用干冰运输,收到后应存放于 -80°C ,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 (PT05) 产品试剂盒组分

成分	存储方式
Reagent A (PT05)	打开使用后,保存于 $2-8^{\circ}\text{C}$
Reagent B (PT05)	保存于 -20°C ,避免反复冻融
Reagent C (PT05)	打开使用后,保存于 $2-8^{\circ}\text{C}$
Cas9 mRNA ($1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	保存于 -80°C ,避免反复冻融
EGFP mRNA ($1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 阳性对照	保存于 -80°C ,避免反复冻融
Human <i>TRAC</i> -sgRNA ($1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 阳性对照 ^a	保存于 -80°C ,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 $>90\%$ 。细胞在转染前一天需传代更换新鲜培养基,贴壁转染需提前种板;对于部分原代细胞,建议在适当活化后进行转染。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。
- 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。
- 其他:完全培养基,无菌 EP 管、所需转染的核酸样品

ProteanFect CRISPRMax 转染试剂盒使用说明书

表 2 ProteanFect CRISPRMax（PT05）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(配置完置于冰上)		
1.1 混合 Reagent A（PT05）与 mRNA	在 40 µL Reagent A（PT05）中加入 0.25 µg Cas9 mRNA 和 0.25 µg sgRNA，充分混匀（Reagent A 使用前需颠倒混匀）	在 40 µL Reagent A（PT05）中加入 0.25 µg Cas9 mRNA 和 0.25 µg sgRNA，充分混匀（Reagent A 使用前需颠倒混匀）
1.2 加入 Reagent B（PT05）并混匀	向上述混合液中加入 1.4 µL Reagent B（PT05），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	向上述混合液中加入 0.7µL Reagent B（PT05），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（PT05）混匀	N/A	往上述混合物中加入 13.5 µL Reagent C（PT05）并混匀
2 细胞处理(尽量去除 FBS, 以免影响转染效果)		
2.1 悬浮细胞准备	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 5×10 ⁶ – 1×10 ⁷ cells/mL 备用	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 5×10 ⁶ – 1×10 ⁷ cells/mL 备用
2.2 贴壁细胞准备 ^c	转染前汇合率应保持在 50%-80%；弃去培养基后，用 Opti-MEM 轻柔清洗细胞两次，加入 20 µL 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 轻柔清洗细胞两次，加入 20 µL Opti-MEM 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 µL 细胞悬液混合后，在离心管中孵育；或直接将转染体系加入贴壁细胞中	将配置好的 ProteanFect 转染体系与 20 µL 细胞悬液混合后，在离心管中孵育；或直接将转染体系加入贴壁细胞中
3.2 孵育	37℃培养箱孵育 45-60 分钟 ^d	37℃培养箱孵育 15 分钟 ^d
3.3 终止反应与洗涤	加入约 5 倍转染体系体积（200 µL）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）；贴壁细胞可直接弃去混合液并补加培养基	加入约 5 倍转染体系体积（250 µL）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）；贴壁细胞可直接弃去混合液并补加培养基
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 ^e	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 ^e

a, 对于原代细胞，建议在转染前进行适当的激活处理，以提高转染效果。

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, 部分贴壁细胞可通过悬浮转染方式提升转染效率，即在转染当日将细胞消化为单细胞悬液，后续操作流程与悬浮细胞一致。

d, 孵育时间可根据不同细胞类型进行适当调整。对于细胞系，孵育时间建议不超过 2 小时；对于原代细胞，孵育时间建议不超过 45 分钟。

e, 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 µL Reagent A（PT04）中加入 0.5 µg 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。

ProteanFect CRISPRMax 转染试剂盒使用说明书

表 3 ProteanFect CRISPRMax（PT05）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	细胞系	原代细胞
Reagent A（PT05）	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（PT05）	96 孔	1.4 μL	0.7 μL
	48 孔	2.8 μL	1.4 μL
	24 孔	7 μL	3.5 μL
	12 孔	21 μL	10.5 μL
	6 孔	28 μL	14 μL
Reagent C（PT05）	96 孔	NA	13.5 μL
	48 孔		27 μL
	24 孔		67 μL
	12 孔		202 μL
	6 孔		270 μL
推荐每孔细胞数（Opti-MEM）	96 孔	1×10 ⁵ ~2×10 ⁵ （20 μL）	
	48 孔	2×10 ⁵ ~4×10 ⁵ （40 μL）	
	24 孔	5×10 ⁵ ~1×10 ⁶ （100 μL）	
	12 孔	1.5×10 ⁶ ~3×10 ⁶ （300 μL）	
	6 孔	2×10 ⁶ ~4×10 ⁶ （400 μL）	

数据分享

ProteanFect CRISPRMax 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。

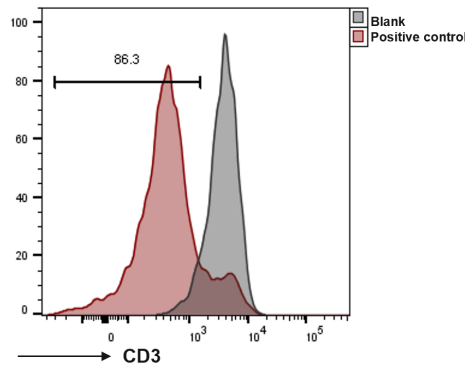


图 1. ProteanFect CRISPRMax (PT05) 转染试剂盒编辑人原代 T 细胞中 *TRAC* 基因后，TCR 蛋白表达的流式检测结果。流式结果显示，阳性对照组中约 86% 的 T 细胞为 CD3 阴性，表明该试剂盒同时递送 Cas9 mRNA/sgRNA，总细胞群中约有 86% 细胞的 *TRAC* 基因被成功编辑。

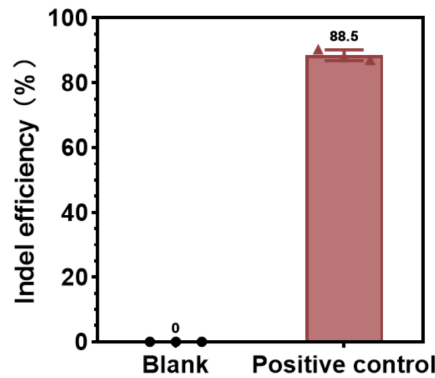


图 2. ProteanFect CRISPRMax (PT05) 转染试剂盒编辑人原代 T 细胞中 *TRAC* 基因的测序分析结果。收集转染后的总细胞提取基因组 DNA，对靶点位置 PCR 扩增（正向引物序列：GCAGTATTATTAAGTAGCCCT，反向引物序列：AACAAGGCTCACTGTTTCTT）并进行 Sanger 测序，通过 TIDE 对测序结果进行分析，结果显示阳性对照组中靶点基因被编辑的比例约为 88.5%，与流式检测蛋白水平的敲除结果（CD3-TCR 流式阴性比例）相当。

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 4-7 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

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，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。

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。

11. 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。

