

产品简介

ProteanFect CRISPR Ultra 转染试剂盒是 ProteanFect 系列产品中专为难转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，为一种非病毒、非电转、非脂质体的转染试剂，能够更高效且安全地将基因编辑工具 RNP（Cas9 protein 和 guide RNA）递送至细胞内，进而实现高效的基因编辑。

试剂盒储存与成分说明

ProteanFect CRISPR Ultra 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 CRISPR Ultra (PT07) 产品试剂盒组分

成分	存储方式
Reagent A (PT07)	打开使用后，保存于 $2-8^{\circ}\text{C}$
Reagent B (PT07)	保存于 -20°C ，避免反复冻融
Cas9 protein ($1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	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 $>90\%$ ；
- 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 CRISPR Ultra 转染试剂盒使用说明书

表 2 ProteanFect CRISPR Ultra (PT07) 转染试剂盒操作步骤说明 (以 96 孔板体系为例)

操作步骤	细胞系转染
1 配置 ProteanFect 转染体系 (配置完置于冰上)	
1.1 混合 Reagent A (PT07) 与 Cas9 protein 和 sgRNA	在 40 μ L Reagent A (PT07) 中加入 0.8 μ g (约 5 pmol) Cas9 protein 和 0.3 μ g (约 10 pmol) sgRNA, 充分混匀 (Reagent A 使用前需颠倒混匀)
1.2 加入 Reagent B (PT07) 并混匀	往上述混合物中加入 1.4 μ L Reagent B (PT07), 移液枪上下吹打 20-30 次或涡旋 10 秒, 使其充分混匀 ^a
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
2.2 贴壁细胞准备 ^b	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, 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; 或直接将转染体系加入贴壁细胞中
3.2 孵育	37°C 培养箱孵育 45-60 分钟 ^c
3.3 终止反应与洗涤	加入约 5 倍转染体系体积 (200 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); 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 ^d

a, 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。

b, 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。

c, 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。

d, 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 (PT07) 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 CRISPR Ultra（PT07）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
Reagent A（PT07）	96 孔	40 μL
	48 孔	80 μL
	24 孔	200 μL
	12 孔	600 μL
	6 孔	800 μL
Cas9 protein/sgRNA	96 孔	0.8 μg/0.3 μg
	48 孔	1.6 μg/0.6 μg
	24 孔	4 μg/1.5 μg
	12 孔	7.5μg/4.5 μg
	6 孔	16 μg/6 μg
Reagent B（PT07）	96 孔	1.4 μL
	48 孔	2.8 μL
	24 孔	7 μL
	12 孔	21 μL
	6 孔	28 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	4×10 ⁵ ~1×10 ⁶ （100 μL）
	12 孔	1×10 ⁶ ~3×10 ⁶ （300 μL）
	6 孔	2×10 ⁶ ~4×10 ⁶ （400 μL）

数据分享

使用 ProteanFect CRISPR Ultra (PT07) 转染试剂盒转染 Jurkat 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 DNA 水平 (图 1 和图 2) 检测基因敲除的效率。

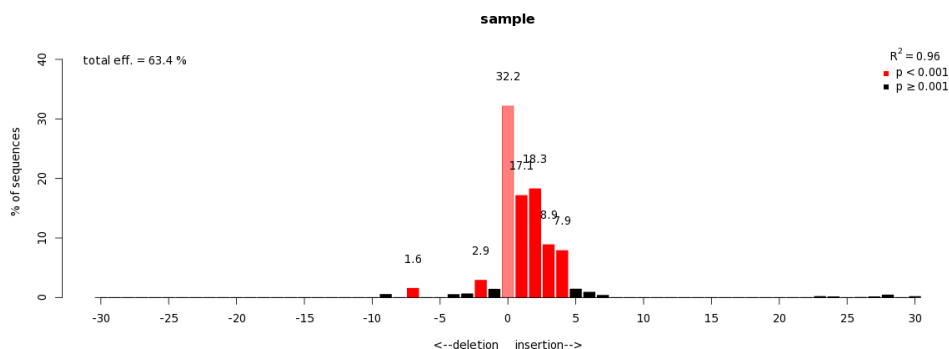


图 1.使用 ProteanFect CRISPR Ultra (PT07) 转染试剂盒编辑 Jurkat 细胞中 *TRAC* 基因的测序分析结果。收集转染后的总细胞提取基因组 DNA, 对靶点位置 PCR 扩增 (正向引物序列: GCAGTATTATTAAGTAGCCCT, 反向引物序列: AACAAAGGCTCACTGTTTCTT) 并进行 Sanger 测序, 通过 TIDE 对测序结果进行分析, 结果显示阳性对照组中靶点基因被编辑的比例约为 63.4%。

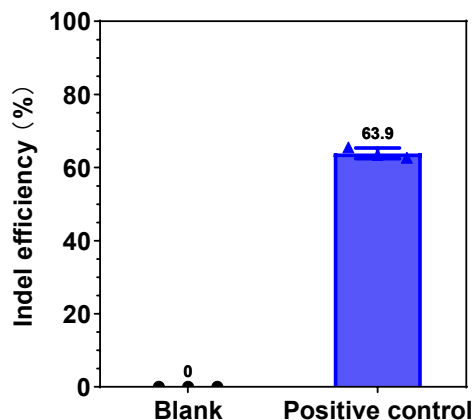


图 2. Jurkat 细胞中靶点 *TRAC* 基因的测序分析编辑效率统计图。转染后总细胞中靶点基因编辑比例平均约为 63.9%。

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. 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。

4. RNP 的投入量如何确定

RNP 中 Cas9 蛋白和 sgRNA 的摩尔比推荐在 1: 1-1: 2.5 之间。以 96 孔细胞量的转染体系为例，Cas9 蛋白的投入量在 0.8 μ g-1.6 μ g，已能够达到单基因编辑的理想效率。

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 10 pmol。

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。

