

ProteanFect CRISPR 转染试剂盒使用说明书

产品简介

ProteanFect CRISPR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。该试剂盒基于内源蛋白凝聚体，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以mRNA形式（Cas9 mRNA和guide RNA）递送至细胞内，实现高效的基因编辑。

试剂盒储存与成分说明

ProteanFect CRISPR转染试剂盒采用干冰运输，收到后应存放于 -20℃到-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（PT04）产品试剂盒组分

成分	存储方式
Reagent A（PT04）	打开使用后，保存于2-8℃
Reagent B（PT04）	保存于-20℃，避免反复冻融
Reagent C（PT04）	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%。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。
- 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、无RNA酶无菌吸头、待转染的核酸样品（无酶无菌水溶解）。

ProteanFect CRISPR 转染试剂盒使用说明书

表2 ProteanFect CRISPR（PT04）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	
1 配置ProteanFect转染体系（配置完置于冰上）	
1.1 混合Reagent A（PT04）与RNA	在40 μL Reagent A（PT04）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（PT04）并混匀	往上述混合物中加入1.4 μL Reagent B（PT04），移液枪上下吹打20-30次或涡旋10秒，使其充分混匀 ^a
1.3 [可选步骤]加入Reagent C（PT04）	加入 8 μL Reagent C（PT04），轻柔吹打 2–3 次或涡旋 2–3 秒混匀。 提示：Reagent C 专为难转染细胞设计，可显著提升部分细胞系转染效率。初次转染时，建议设立“添加”与“不添加” Reagent C 的平行对照实验，以确定最佳转染条件。
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 $5\times 10^6 - 1\times 10^7$ 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 μL Opti-MEM备用
3 细胞转染	
3.1混合转染体系与细胞	悬浮转染——吸取 20 μL 细胞悬液（ $1\times 10^5 - 2\times 10^5$ cells），加入配置好的 ProteanFect 转染复合物体系中，轻柔吹打 2–3 次混匀，离心管中孵育； 贴壁转染——将配置好的 ProteanFect 转染复合物体系直接加入贴壁细胞培养孔中，轻柔摇匀
3.2 孵育	37℃培养箱中孵育45-60分钟（未添加Reagent C）或15-45分钟（添加Reagent C） ^c
3.3 终止反应与洗涤	悬浮转染——加入 200 μL（约 5 倍 Reagent A 体积）完全培养基以终止反应，300 g 常温离心 5 分钟，小心吸弃上清液（可保留少量液体以减少细胞损失）； 贴壁转染——直接小心吸弃孔中的转染混合液
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. 孵育时间可根据转染后细胞活率和转染效率进行适当调整。在未添加 Reagent C 的条件下，转染孵育时间不宜超过 2 小时；若添加 Reagent C，孵育时间不宜超过 1 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 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 5–24 小时内可观察 EGFP 表达。

ProteanFect CRISPR 转染试剂盒使用说明书

表3 ProteanFect CRISPR（PT04）转染不同细胞培养孔板规格的各组分使用含量

*悬浮转染推荐试剂用量及细胞悬液体积可根据表2、表3中最小体系等比放大
*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
*Reagent C 为可选组分。常规细胞系可不添加（0 μL）；难转染细胞系如需添加，请按表中标注用量使用。

组分	孔板类型	用量
Reagent A（PT04）	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（PT04）	96孔	1.4 μL
	48孔	2.8 μL
	24孔	7 μL
	12孔	21 μL
	6孔	28 μL
[可选步骤] Reagent C（PT04）	96孔	0/8 μL
	48孔	0/16 μL
	24孔	0/40 μL
	12孔	0/120 μL
	6孔	0/160 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

ProteanFect CRISPR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，提取DNA通过PCR测序（图1和图2）检测基因敲除的效率。

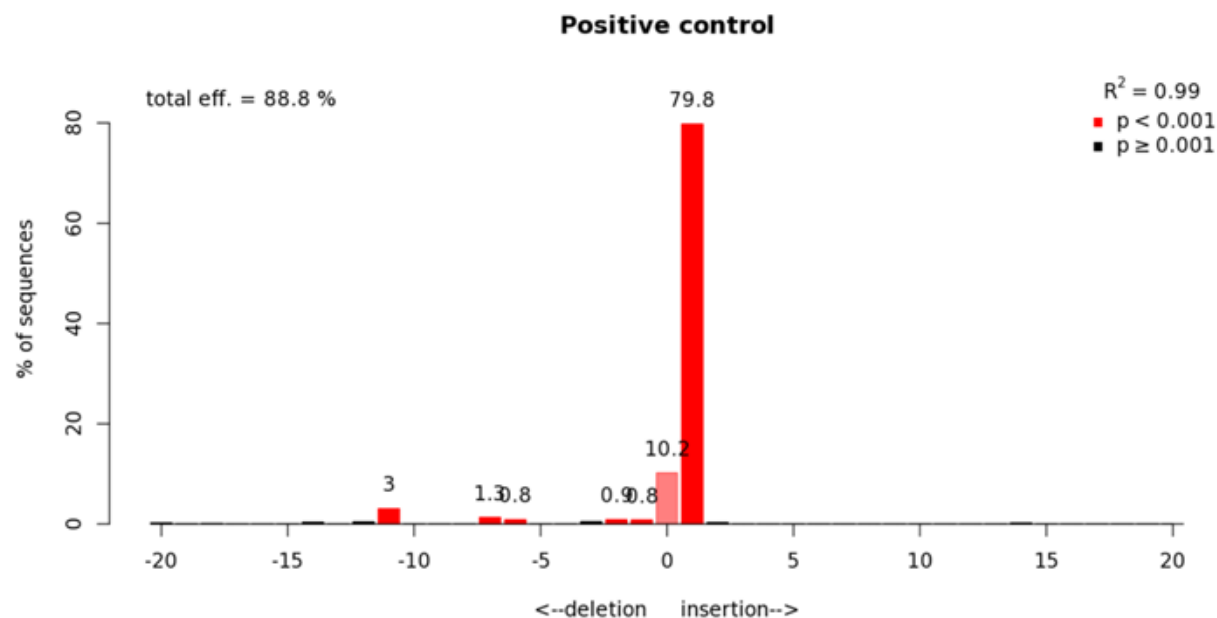


图1. ProteanFect CRISPR (PT04) 转染试剂盒编辑Jurkat细胞中*TRAC*基因的测序分析结果。收集转染后的总细胞提取基因组DNA，对靶点位置PCR扩增（正向引物序列：GCAGTATTATTAAGTAGCCCT，反向引物序列：AACAAGGCTCACTGTTTCTT）并进行Sanger测序，通过TIDE对测序结果进行分析，结果显示阳性对照组中靶点基因被编辑的比例约为88.8%。

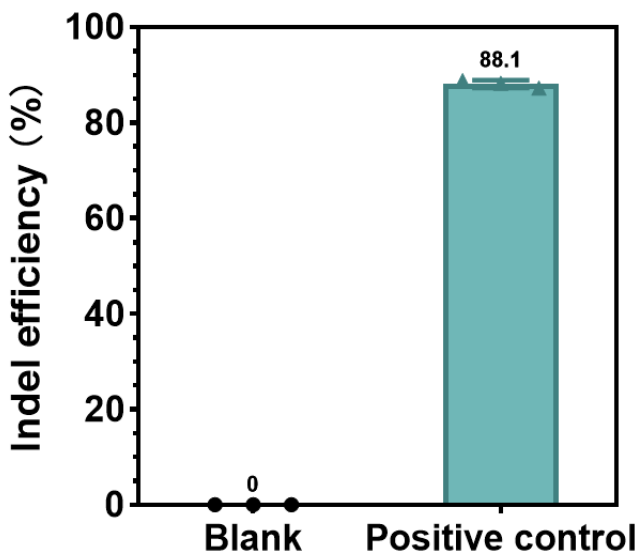


图2. Jurkat细胞中靶点*TRAC*基因的测序分析编辑效率统计图。转染后总细胞中靶点基因编辑比例平均约为88.1%。

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。在未添加 Reagent C 的条件下，转染孵育时间不宜超过 2 小时；若添加 Reagent C，孵育时间不宜超过 1 小时。2) 添加/提升Reagent C用量：对于细胞系转染，可在体系中添加适当的Reagent C，以96孔板为例，添加8-13.5 μL 。3) 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. 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。

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。

