

ProteanFect CRISPRMax 转染试剂盒使用说明书

产品简介

ProteanFect CRISPRMax转染试剂盒是ProteanFect Max系列中专为原代细胞基因编辑而设计。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 -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 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℃
Reagent B（PT05）	保存于-20℃，避免反复冻融
Reagent C（PT05）	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；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（无酶无菌水溶解）。

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	
1 配置ProteanFect转染体系（配置完置于冰上）	
1.1 混合Reagent A（PT05）与RNA	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 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 ^a
1.3加入Reagent C（PT05）混匀	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
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（ 1×10^5 – 2×10^5 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15分钟 ^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. 孵育时间可根据不同细胞类型进行适当调整。原代细胞，孵育时间建议不超过 45 分钟。
- 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（PT05）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 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	用量
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	0.7 μL
	48孔	1.4 μL
	24孔	3.5 μL
	12孔	10.5 μL
	6孔	14 μL
Reagent C (PT05)	96孔	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	$1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ (20 μL)
	48孔	$2 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$ (40 μL)
	24孔	$4 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ (100 μL)
	12孔	$1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ (300 μL)
	6孔	$2 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ (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。

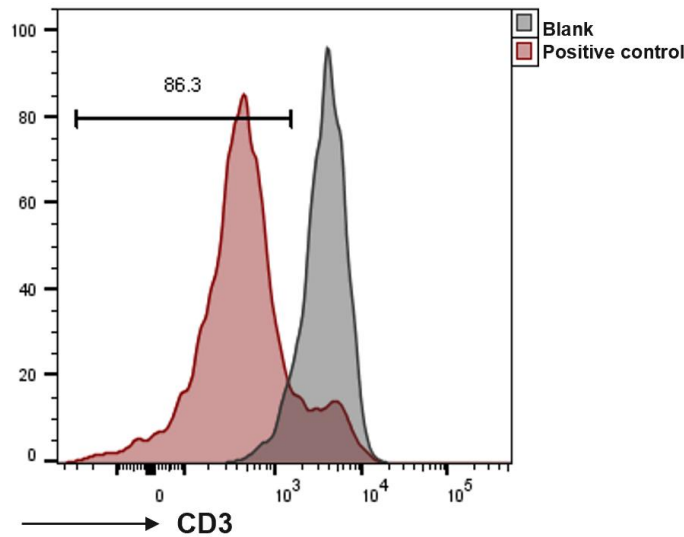


图1. ProteanFect CRISPRMax (PT05) 转染试剂盒编辑人原代T细胞中*TRAC*基因后，TCR蛋白表达的流式检测结果。流式结果显示，阳性对照组中约86%的T细胞为CD3阴性，表明该试剂盒同时递送Cas9 mRNA/sgRNA，总细胞群中约有86%细胞的*TRAC*基因被成功编辑。

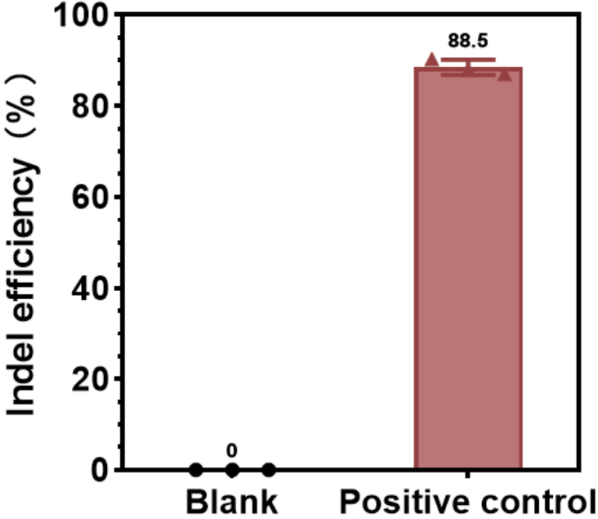


图2. ProteanFect CRISPRMax (PT05) 转染试剂盒编辑人原代T细胞中*TRAC*基因的测序分析结果。收集转染后的总细胞提取基因组DNA，对靶点位置PCR扩增（正向引物序列：GCAGTATTATTAAGTAGCCCT，反向引物序列：AACAAGGCTCACTGTTTCTT）并进行Sanger测序，通过TIDE对测序结果进行分析，结果显示阳性对照组中靶点基因被编辑的比例约为88.5%，与流式检测蛋白水平的敲除结果（CD3-TCR流式阴性比例）相当。

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45分钟。**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. 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）。

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。

