

ProteanFect CRISPRMax Ultra 转染试剂盒使用说明书

产品简介

ProteanFect CRISPRMax Ultra转染试剂盒是ProteanFect Max系列中的一款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，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。

试剂盒成分与储存说明

ProteanFect CRISPRMax Ultra转染试剂盒采用干冰运输，收货后需存放于-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 Ultra（PT08）产品试剂盒组分

成分	存储方式
Reagent A（PT08）	打开使用后，保存于2-8℃
Reagent B（PT08）	保存于-20℃，避免反复冻融
Reagent C（PT08）	打开使用后，保存于2-8℃
Cas9 protein（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、待转染的核酸样品（无酶无菌水溶解）。

ProteanFect CRISPRMax Ultra 转染试剂盒使用说明书

表2 ProteanFect CRISPRMax Ultra（PT08）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（PT08）与Cas9 protein和sgRNA	在40 μL Reagent A（PT08）中加入0.8 μg（约5 pmol）Cas9 protein和0.3 μg（约10 pmol）sgRNA，充分混匀（Reagent A使用前需颠倒混匀）
1.2 加入Reagent B（PT08）并混匀	往上述混合物中加入0.7 μL Reagent B（PT08），移液枪上下吹打20-30次或涡旋10秒，使其充分混匀 ^a
1.3加入Reagent C（PT08）混匀	往上述混合物中加入13.5 μL Reagent C（PT08）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（PT08）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 Ultra 转染试剂盒使用说明书

表3 ProteanFect CRISPRMax Ultra（PT08）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（PT08）	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	12 μg/4.5 μg
	6孔	16 μg/6 μg
Reagent B（PT08）	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（PT08）	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 × 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 CRISPRMax Ultra（PT08）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。

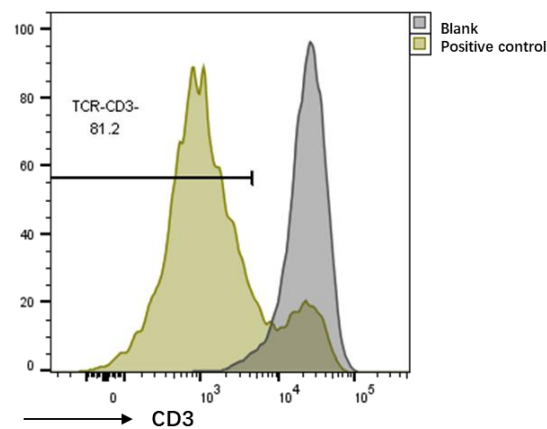


图1. 使用ProteanFect CRISPRMax Ultra（PT08）转染试剂盒编辑人原代T细胞中*TRAC*基因后，CD3蛋白表达的流式检测结果。流式结果显示，阳性对照组中约81%的T细胞为CD3阴性，表明该试剂盒同时递送Cas9 protein/sgRNA，总细胞群中约有81%细胞的*TRAC*基因被成功编辑。

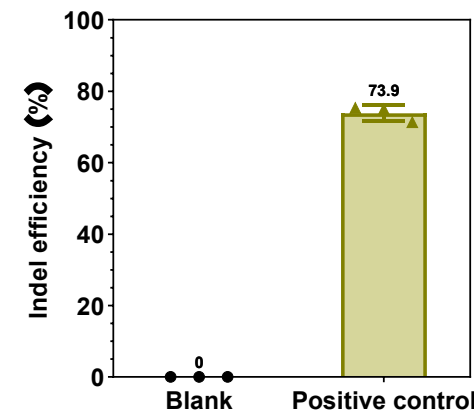


图2.使用ProteanFect CRISPRMax Ultra（PT08）转染试剂盒编辑人原代T细胞中*TRAC*基因的测序分析结果。收集转染后的总细胞提取基因组DNA，对靶点位置PCR扩增（正向引物序列：GCAGTATTATTAAGTAGCCCT，反向引物序列：AACAAGGCTCACTGTTTCTT）并进行Sanger测序，通过TIDE对测序结果进行分析，结果显示阳性对照组中靶点基因被编辑的比例约为73.9%，与流式检测蛋白水平的敲除结果（CD3流式阴性比例）相当。

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. 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 µg-1.6 µg，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。

