

# ProteanFect CRISPR Cas9 基因编辑 转染试剂盒使用说明书

## 产品简介

ProteanFect CRISPR Cas9 基因编辑转染试剂盒在 ProteanFect 系列产品中专门用于难转细胞系基因编辑。ProteanFect 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。ProteanFect CRISPR Cas9 基因编辑转染试剂盒能够更高效且安全地将基因编辑工具递送至细胞内，进而实现高效的基因编辑。

## 试剂盒储存与成分说明

ProteanFect CRISPR Cas9 基因编辑转染试剂盒采用干冰运输，收货后需存放于推荐储存温度下直至使用。**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 Cas9 产品试剂盒组分

成分	存储方式
Reagent A (for CRISPR/Cas9)	打开使用后，保存于 2-8°C
Reagent B (for CRISPR/Cas9)	保存于-20°C，避免反复冻融
Cas9 mRNA (1 µg/µL)	保存于-80°C，避免反复冻融
EGFP mRNA (1 µg/µL) 阳性对照	保存于-80°C，避免反复冻融
Human TRAC-sgRNA (1 µg/µL) 阳性对照 <sup>a</sup>	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；
- 其他：完全培养基，无菌 EP 管、所需转染的核酸样品。

# ProteanFect CRISPR Cas9 基因编辑 转染试剂盒使用说明书

表 2 ProteanFect CRISPR Cas9 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
<b>1 配置 ProteanFect 转染体系</b>	
1.1 将 Reagent A (for CRISPR/Cas9) 与 mRNA 混合	在 40 $\mu\text{L}$ Reagent A (for CRISPR/Cas9) 中加入 0.25 $\mu\text{g}$ Cas9 mRNA 和 0.25 $\mu\text{g}$ sgRNA，充分混匀（Reagent A 使用前需颠倒混匀）
1.2 加入 Reagent B (for CRISPR/Cas9) 轻柔充分混匀	往上述混合物中加入 1.4 $\mu\text{L}$ Reagent B (for CRISPR/Cas9)混匀 <sup>a</sup>
<b>2 细胞处理</b>	
2.1 悬浮细胞准备（尽量去除 FBS，以免影响转染效果）	取待转染细胞，300 $g$ 离心 5 分钟，收集细胞沉淀，去上清，加入 Opti-MEM 重悬并洗涤，调至 $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$ cells/mL 备用
2.2 贴壁细胞准备（尽量去除 FBS，以免影响转染效果）	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 $\mu\text{L}$ Opti-MEM 备用
<b>3 细胞转染</b>	
3.1 混合转染体系与细胞	将上述配置好的 ProteanFect 转染体系与 20 $\mu\text{L}$ 细胞悬液（可直接在离心管中孵育）或直接加入贴壁细胞，混合均匀
3.2 孵育	37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 45-60 分钟 <sup>b</sup>
3.3 终止反应与洗涤	对于悬浮细胞加入至少 200 $\mu\text{L}$ 完全培养基，300 $g$ 离心 5 分钟，弃上清；对于贴壁细胞，直接弃去混合液，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，后续可根据实验目的进行基因表达检测 <sup>c</sup>

a, ProteanFect 转染体系在配置过程中可能会出现一定的粘稠现象，属于正常情况。

b, 孵育时间可根据不同细胞类型有所调整，建议孵育时间不超过 2 小时。

c, EGFP mRNA 阳性对照可用于转染效率检测，具体操作方法为，1.1 在 40  $\mu\text{L}$  Reagent A (for CRISPR/Cas9) 中加入 0.5  $\mu\text{g}$  EGFP mRNA 充分混匀，其它步骤同表 2。可在转染后 5-48 小时内观察到 EGFP 的表达，24 小时流式检测阳性率。

# ProteanFect CRISPR Cas9 基因编辑 转染试剂盒使用说明书

表 3 ProteanFect CRISPR Cas9 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

组分	孔板类型	细胞系
Reagent A (for CRISPR/Cas9)	96 孔	40 $\mu$ L
	48 孔	80 $\mu$ L
	24 孔	200 $\mu$ L
	12 孔	600 $\mu$ L
	6 孔	800 $\mu$ L
Cas9 mRNA/sgRNA	96 孔	0.25 $\mu$ g/0.25 $\mu$ g
	48 孔	0.5 $\mu$ g/0.5 $\mu$ g
	24 孔	1.25 $\mu$ g/1.25 $\mu$ g
	12 孔	3.75 $\mu$ g/3.75 $\mu$ g
	6 孔	5 $\mu$ g/5 $\mu$ g
Reagent B (for CRISPR/Cas9)	96 孔	1.4 $\mu$ L
	48 孔	2.8 $\mu$ L
	24 孔	7 $\mu$ L
	12 孔	21 $\mu$ L
	6 孔	28 $\mu$ L
推荐每孔细胞数 (Opti-MEM)	96 孔	$1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ (20 $\mu$ L)
	48 孔	$2 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$ (40 $\mu$ L)
	24 孔	$5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ (100 $\mu$ L)
	12 孔	$1.5 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ (300 $\mu$ L)
	6 孔	$2 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ (400 $\mu$ L)

# ProteanFect CRISPR Cas9 基因编辑 转染试剂盒使用说明书

## 数据分享

使用 ProteanFect CRISPR Cas9 基因编辑转染试剂盒转染 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。

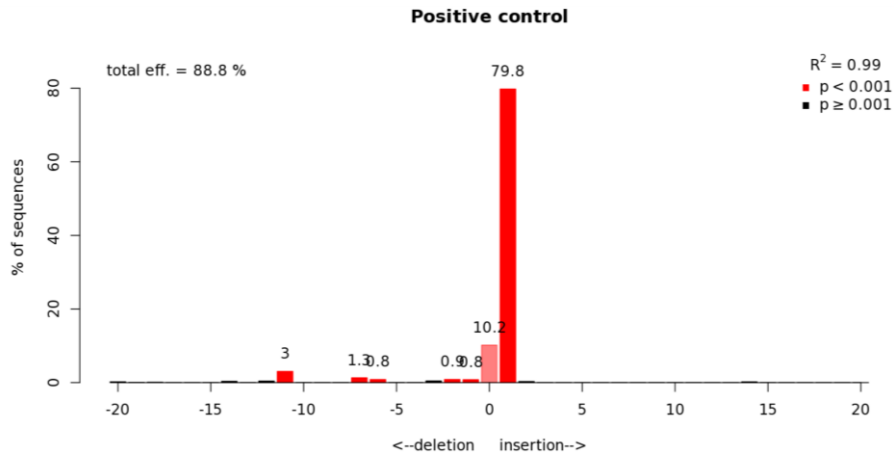


图 1.使用 ProteanFect CRISPR Cas9 基因编辑转染试剂盒编辑 Jurkat 细胞中 *TRAC* 基因的测序分析结果。收集转染后的总细胞提取基因组 DNA，对靶点位置 PCR 扩增（正向引物序列：GCAGTATTATTAAGTAGCCCT，反向引物序列：AACAAGGCTCACTGTTTCTT）并进行 Sanger 测序，通过 TIDE 对测序结果进行分析，结果显示阳性对照组中靶点基因被编辑的比例约为 88.8%。

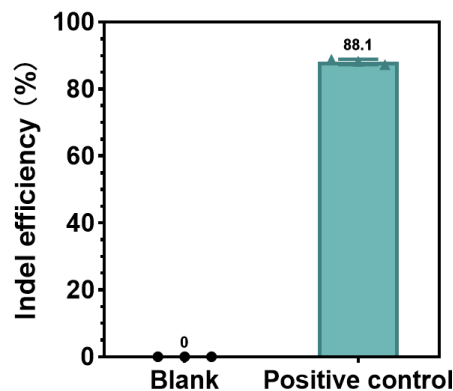


图 2. Jurkat 细胞中靶点 *TRAC* 基因的测序分析编辑效率统计图。转染后总细胞中靶点基因编辑比例平均约为 88%。

# ProteanFect CRISPR Cas9 基因编辑 转染试剂盒使用说明书

---

## 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 1 小时，细胞系不超过 2 小时。**2) 提升 Reagent B 用量**：适当增加 Reagent B 的用量，以 96 孔板为例，细胞系推荐为 1-3  $\mu\text{L}$ ，根据具体情况进行调整。**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。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  $\mu\text{g}$ 。

### 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  $\mu\text{g}$  Cas9 mRNA、0.2  $\mu\text{g}$  sgRNA、0.1  $\mu\text{g}$  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  $4 \times 10^3$ /孔，以确保后续检测的可靠性。

### 6. 转染后细胞状态与活力

# ProteanFect CRISPR Cas9 基因编辑 转染试剂盒使用说明书

---

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，推荐使用离心管进行孵育，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。

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：[proteanfect@nanoportalbio.com](mailto:proteanfect@nanoportalbio.com)。我们的专业团队将竭诚为您解答疑问，提供技术支持。

