

# ProteanFect CRISPRMax Cas9 基因编辑试剂盒人原代 T 细胞中基因敲除操作攻略

细胞治疗技术利用人自身的细胞资源，为传统医疗提供了一种全新的治疗思路，在多种疾病治疗方面显示出巨大潜力。在科研和临床领域，对人原代细胞进行各种基因编辑可以深入探究基因功能，揭示疾病机制，为免疫相关疾病的治疗提供新的策略和靶点。此外，基因敲除技术在改进 CAR-T 等细胞疗法中也扮演着关键角色，通过增强 T 细胞的抗肿瘤活性、持久性和安全性，为患者带来更为有效的个性化治疗方案。目前，CRISPR/Cas9 技术已经成为较为成熟的 DNA 编辑工具。ProteanFect CRISPRMax Cas9 基因编辑试剂盒可高效、低毒、简便地将 Cas9 mRNA 和 sgRNA 同时递送至原代 T 细胞中对基因组进行改造。本文将详细介绍如何使用 ProteanFect CRISPRMax Cas9 基因编辑试剂盒实现人原代 T 细胞的基因敲除。

## 实验前准备

**人原代 T 细胞：**合适的培养条件和激活方法对细胞的成功转染非常关键。**T 细胞转染前需要充分活化，以实现较高的转染效率。**

**ProteanFect CRISPRMax Cas9 基因编辑试剂盒：**包含 Reagent A (for CRISPR/Cas9)，Reagent B (for CRISPR/Cas9)，Reagent C (for CRISPR/Cas9)，Cas9 mRNA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )，EGFP mRNA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) 阳性对照，human *TRAC*-sgRNA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) 对照。

**sgRNA：**化学合成或体外转录。

## 人原代 T 细胞的分离与活化

**人原代 T 细胞的分离：**取用来自全血或血沉棕黄层的单核细胞 (MNCs) 或外周血单核细胞 (PBMCs)，可以使用市面上阴性选择或者阳性选择分离得到 T 细胞亚群 (包括 CD3<sup>+</sup> T 细胞、CD4<sup>+</sup> T 细胞或 CD8<sup>+</sup> T 细胞)。

**人原代 T 细胞的活化：**CD3/CD28 激活磁珠是一种常见的人 T 细胞活化剂，能够提供 T 细胞激活与扩增所需的主要和协同刺激信号，显著提高 T 细胞的活化和扩增效率。

## 人原代 T 细胞的培养与传代

1. T 细胞培养与激活过程中，建议在培养基中添加人重组 IL-2，以刺激 T 细胞群的扩增。IL-2 的使用浓度为 300 IU/mL。在转染前，培养过程中无需去除激活磁珠。
2. 建议每 2 天对 T 细胞进行传代，保持细胞密度在  $1 \times 10^6$  /mL。
3. 推荐在 T 细胞激活后 2-10 天进行转染。如果细胞激活与传代时间过长，转染后的细胞活力与转染效率可能会降低。最佳转染时间为激活后 4-7 天，此时转染后的细胞活力和转染效率处于最佳水平。

## 使用 ProteanFect CRISPRMax Cas9 基因编辑试剂盒对人原代 T 细胞进行基因编辑

- 1. 适合转染的培养基:** 使用 Opti-MEM 培养基 (37°C 提前预热或恢复至室温) 进行转染。
- 2. 配置转染体系:** 具体详见表 1-表 2。由于 T 细胞对环境敏感, 建议在转染液配置完成后再次处理细胞 (若细胞处理时间过长, 建议将配置好的转染液暂放于四度冰箱或冰上, 以免影响转染效率)。转染体系在配置过程中出现粘稠现象属于正常。
- 3. 转染前细胞准备:** 转染体系制备完再准备待转细胞, 并确保细胞处于良好生长状态, 活率在 90% 以上。调整细胞转染密度时, 避免反复离心, 以免延长处理时间, 影响细胞活力和转染效率。
- 4. 细胞转染:** 建议孵育时间为 15 分钟左右, 延长时间可能影响细胞活力。
- 5. 编辑效率检测:** 转染 72h 后可对编辑效率进行检测。提取基因组 DNA, 对靶点位置进行 PCR 测序, 分析编辑效率。

表 1. ProteanFect CRISPRMax Cas9 基因编辑试剂盒转染人原代 T 细胞实验操作步骤说明 (以 96 孔板为例)

操作步骤	人原代 T 细胞转染
<b>1 配置转染体系</b>	
1.1 将 Reagent A (for CRISPR/Cas9) 与 RNA 混合	在 40 $\mu$ L Reagent A (for CRISPR/Cas9) 中加入 0.25 $\mu$ g Cas9 mRNA 和 0.25 $\mu$ g sgRNA, 充分混匀
1.2 加入 Reagent B (for CRISPR/Cas9)	往上述混合物中加入 0.7 $\mu$ L Reagent B (for CRISPR/Cas9), 混匀
1.3 加入 Reagent C (for CRISPR/Cas9)	往上述混合物中加入 13.5 $\mu$ L Reagent C (for CRISPR/Cas9), 混匀
<b>2 细胞处理 (转染体系制备完再准备待转细胞)</b>	
2.1 人原代 T 细胞准备 (尽量去除 FBS, 以免影响转染效果)	取待转染人原代 T 细胞, 300 g 离心 5 分钟, 去上清, 收集细胞沉淀, 加入 Opti-MEM (提前预热或恢复至室温) 重悬并洗涤一次, 细胞悬液调至 $5 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$ cells/mL 备用
<b>3 细胞转染</b>	
3.1 混合转染体系与细胞	将步骤 1.3 中制备的转染混合液与 20 $\mu$ L 细胞悬液混合均匀 (可直接在离心管中孵育)
3.2 孵育	37°C 培养箱孵育 15 分钟
3.3 终止反应与洗涤	加入至少 200 $\mu$ L 完全培养基, 300 g 离心 5 分钟, 弃上清 (为避免细胞损失, 无需完全弃尽)
3.4 细胞培养与检测	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

表 2. 转染不同细胞培养孔板规格的各组分推荐用量

\*大体系转染推荐使用离心管孵育

组分	孔板类型	加样量
<b>Reagent A (for CRISPR/Cas9)</b>	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
<b>Cas9 mRNA/sgRNA</b>	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
<b>Reagent B (for CRISPR/Cas9)</b>	96 孔	0.7 $\mu$ L
	48 孔	1.4 $\mu$ L
	24 孔	3.5 $\mu$ L
	12 孔	10.5 $\mu$ L
	6 孔	14 $\mu$ L
<b>Reagent C (for CRISPR/Cas9)</b>	96 孔	13.5 $\mu$ L
	48 孔	27 $\mu$ L
	24 孔	67.5 $\mu$ L
	12 孔	202 $\mu$ L
	6 孔	270 $\mu$ L
<b>推荐每孔细胞数 (Opti-MEM)</b>	96 孔	$1 \times 10^5$ - $2 \times 10^5$ (20 $\mu$ L)
	48 孔	$2 \times 10^5$ - $4 \times 10^5$ (40 $\mu$ L)
	24 孔	$5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$ (100 $\mu$ L)
	12 孔	$1.5 \times 10^6$ - $3 \times 10^6$ (300 $\mu$ L)
	6 孔	$2 \times 10^6$ - $4 \times 10^6$ (400 $\mu$ L)

## 使用 ProteanFect CRISPRMax Cas9 基因编辑试剂盒在人原代 T 细胞中进行 TRAC 基因敲除实例

特别提示：本文所提及的品牌货号仅供参考，用户可根据实验需求进行选择。

### (1) 实验前准备

本实验 T 细胞培养的培养基成分如表 3 所示。

表 3. 人原代 T 细胞培养培养基成分

成分	品牌货号
X-VIVO™ 15 培养基	Lonza, 04-418Q
FBS, 10%	Gibco™, 10099141C
注射用人白介素 2, 300 IU/mL	/
青霉素-链霉素-新霉素 (PSN) 抗生素混合物 (可选)	Gibco™, 15640055

### (2) 分离与活化

本实验所用细胞分离和活化试剂盒为 Dynabeads™ Human T-Expander CD3/CD28 (Thermo Fisher, 11141D)。具体实验操作参考其官方说明书。

### (3) 培养与传代

T 细胞激活 2-10 天后都可进行转染。最佳转染时间为激活 4-7 天，此时转染后的细胞活力和转染效率处于最佳水平。本次实验在磁珠激活第 6 天转染。

### (4) 细胞转染 (24 孔)

本次实验使用的 sgRNA 为试剂盒中 human TRAC-sgRNA (靶向序列：TGTGCTAGACATGAGGTCTA) 阳性对照。

转染方案(由于 ProteanFect 系列试剂盒可高效共转多个基因,因此在本次实验中共转 EGFP mRNA 用于检测 Cas9 mRNA/sgRNA 的转染效率)

组别	敲除组 (KO)	对照组 (NC)
Cas9 mRNA	1 µg	1 µg
sgRNA	1 µg	N/A
EGFP mRNA	0.5 µg	0.5 µg
Reagent A (for CRISPR/Cas9)	200 µL	200 µL
Reagent B (for CRISPR/Cas9)	3.5 µL	3.5 µL
Reagent C (for CRISPR/Cas9)	67.5 µL	67.5 µL
细胞数	$8 \times 10^5$	$8 \times 10^5$

具体转染步骤参照表 1。

## (5) 编辑效率分析

### 蛋白水平检测:

在转染 72h 后, 收集约  $1 \times 10^6$  个细胞, 加入 1 mL PBS, 300 g 离心 5 分钟, 去上清, 收集细胞沉淀, 加入 50  $\mu$ L 配置好的 CD3-TCR 抗体 (Biogend, Cat.300318, 1:100 用 PBS 配置), 室温孵育 15 min, 加入 1 mL PBS, 300 g 离心 5 分钟, 去上清, 加入 50  $\mu$ L PBS 重悬细胞后进行流式检测 (图 1)。

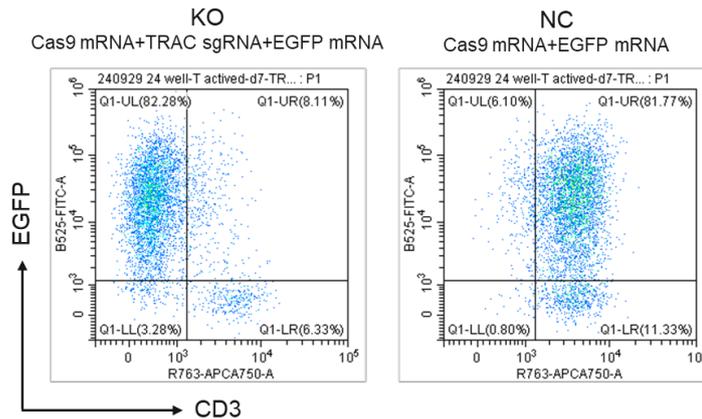


图 1.使用 ProteanFect CRISPRMax Cas9 基因编辑试剂盒对人原代 T 细胞进行 *TRAC* 基因敲除的流式分析结果。流式结果显示, KO 组 (左) 中约 85% 的 T 细胞为 CD3 阴性, 表明 *TRAC* 基因敲除的效率较高。同时, CD3 阴性和 EGFP 阳性信号具有较高相关性, 表明 EGFP mRNA 与 Cas9 mRNA/sgRNA 共转的表达一致性良好, 即 EGFP 可以作为筛选基因, 方便后续筛选成功基因编辑的细胞。

### DNA 水平检测:

在转染 72h 后, 收集约  $1 \times 10^5$  个细胞 300 g 离心 5 分钟, 去上清, 收集细胞提取 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 网站 ([TIDE: Tracking of Indels by DEcomposition](https://tidesoftware.com/)) 对测序结果进行分析 (图 2)。

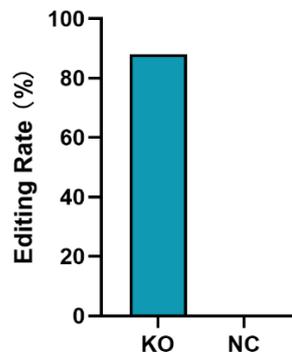


图 2. 人原代 T 细胞中 *TRAC* 基因敲除 DNA 水平分析结果。利用 ProteanFect CRISPRMax Cas9 基因编辑试剂盒, 对基因 *TRAC* 位点的编辑效率可达 88%, 与流式检测蛋白水平的敲除结果 (CD3-TCR 流式阴性比例) 一致。

## 常见问题

### 1. 如何提升转染效率

延长转染时间：根据细胞状态适当延长转染时间，通常不超过 30 分钟。时间过长影响细胞活率。

### 2. 细胞活率较低

降低 Reagent C (for CRISPR/Cas9) 用量：以 96 孔板为例，可将 Reagent C 体积降低至 8  $\mu\text{L}$ ，孵育时间为 15 分钟至 30 分钟。

### 3. 质粒 DNA 能否用于原代细胞转染

双链 DNA 转染原代 T 细胞可能会引起一定的毒性，例如炎症应激等，因此需根据实验目的谨慎选择。

### 4. 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  $\mu\text{g}$ 。

### 5. 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。共转数据参考实例中的图 1。

### 6. 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。

### 7. 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。

### 8. 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。

### 9. 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 2，不会影响转染效率。

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

