

ProteanFect Max 小鼠原代免疫细胞转染试剂盒使用说明书

产品简介

ProteanFect Max 小鼠原代免疫细胞转染试剂盒是一款基于自组装蛋白纳米颗粒的核酸转染试剂，专为小鼠原代免疫细胞设计。作为一种非病毒、非电转、非脂质体的转染试剂，在延续 ProteanFect Max 优势的基础上，这款试剂盒可更为高效安全地将基因递送至小鼠原代免疫细胞中。

试剂盒储存与成分说明

ProteanFect Max 小鼠原代免疫细胞转染试剂盒在干冰中运输，收到后应存放于 -20°C ，直至使用。**试剂盒规格依据 Reagent B 的体积设定。**试剂盒也包含阳性对照样品，编码绿色荧光蛋白（EGFP）的 mRNA，以验证实验操作及试剂效果。开封后，为确保试剂的最佳性能，需根据表 1 中的存储条件妥善保管各组分。

表 1 ProteanFect Max (PT03) 产品试剂盒组分

成分	存储方式
Reagent A (PT03)	打开使用后，保存于 $2-8^{\circ}\text{C}$
Reagent B (PT03)	保存于 -20°C ，避免反复冻融
Reagent C (PT03)	如有析出， 65°C 水浴完全溶解后使用； 打开使用后，保存于 $2-8^{\circ}\text{C}$
EGFP-mRNA ($1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 阳性对照	保存于 -20°C ，避免反复冻融

实验前材料准备

- 待转染细胞：小鼠原代免疫细胞应在适当激活后再进行转染。如小鼠原代 T 细胞应在激活后 2-4 天内进行转染，以确保最佳转染效率和细胞活力。若激活或传代时间过长，可能导致细胞状态下降，影响转染效果。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→鼠原代 T。
- 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。如观察到 Reagent C (PT03) 溶液有析出， 65°C 水浴至完全溶解后使用。
- 其他：完全培养基，无菌 EP 管、所需转染的核酸样品。

ProteanFect Max 小鼠原代免疫细胞转染试剂盒使用说明书

表 2 ProteanFect Max (PT03) 小鼠原代免疫细胞转染操作步骤说明 (以 96 孔板转染 mRNA 为例)

*配置前如观察到 Reagent C (PT03) 溶液有析出, 65°C 水浴至完全溶解后使用

操作步骤	小鼠原代免疫细胞转染 ^a
1 配置 ProteanFect 转染体系 (配置完置于冰上)	
1.1 混合 Reagent A (PT03) 与 mRNA	在 40 μ L Reagent A (PT03) 中加入 0.5 μ g mRNA, 充分混匀 (Reagent A 使用前需颠倒混匀)
1.2 加入 Reagent B (PT03) 并混匀	向上述混合液中加入 0.7 μ L Reagent B (PT03), 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 ^b
1.3 加入 Reagent C (PT03) 混匀	往上述混合物中加入 10 μ L Reagent C (PT03) 混匀
2 细胞处理 (尽量去除 FBS, 以免影响转染效果)	
2.1 小鼠原代免疫细胞准备	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
3 细胞转染	
3.1 混合转染体系与细胞	将配置好的 ProteanFect 转染体系与 20 μ L 细胞悬液混合后, 在离心管中孵育
3.2 孵育	37°C 孵育 15–30 分钟
3.3 终止反应与洗涤	加入约 5 倍转染体系体积 (250 μ L) 的完全培养基, 300 g 离心 5 分钟, 弃去上清 (可保留少量液体以减少细胞损失)
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 ^c

a, 小鼠原代免疫细胞应在适当激活后再进行转染。

b, 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。

c, 阳性对照 mRNA 可在转染后 5–48 小时内检测 EGFP 表达; 转染 siRNA 后敲低效率检测建议在 48–72 小时内进行。

ProteanFect Max 小鼠原代免疫细胞转染试剂盒使用说明书

表 3 ProteanFect Max (PT03) 小鼠原代免疫细胞转染试剂转染不同类型核酸的实验操作步骤说明（以 96 孔板转染为例）

操作步骤	小鼠原代免疫细胞转染	
1 配置 ProteanFect 转染体系	mRNA ^a	siRNA ^b
1.1 混合 Reagent A (PT03) 与核酸	在 40 μL Reagent A (PT03) 中加入 0.5 μg mRNA，充分混匀	在 40 μL Reagent A (PT03) 中加入 20 pmol siRNA，充分混匀
1.2 加入 Reagent B (PT03)	往上述混合物中加入 0.7 μL Reagent B (PT03)	往上述混合物中加入 0.7 μL Reagent B (PT03)
1.3 加入 Reagent C (PT03)	往上述混合物中加入 10 μL Reagent C (PT03)	往上述混合物中加入 10 μL Reagent C (PT03)
2 细胞处理	详见表 2	
3 细胞转染	详见表 2	

a, 建议 mRNA 浓度≥1 μg/μL。如需同时转染多个 mRNA，为确保高效的转染效果，加入的 mRNA 总量为 0.5 μg。

b, 建议 siRNA 浓度≥20 μM。如需同时转染多个 siRNA，为确保高效的转染效果，加入的 siRNA 总量为 20 pmol。

ProteanFect Max 小鼠原代免疫细胞转染试剂盒使用说明书

表 4 ProteanFect Max（PT03）小鼠原代免疫细胞转染试剂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	原代细胞	
Reagent A（PT03）	96 孔	40 μL	
	48 孔	80 μL	
	24 孔	200 μL	
	12 孔	600 μL	
	6 孔	800 μL	
待转染核酸	核酸类型	mRNA	siRNA
	96 孔	0.5 μg	20 pmol
	48 孔	1 μg	40 pmol
	24 孔	2.5 μg	100 pmol
	12 孔	7.5 μg	300 pmol
	6 孔	10 μg	400 pmol
Reagent B（PT03）	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（PT03）	96 孔	10 μL	
	48 孔	20 μL	
	24 孔	50 μL	
	12 孔	150 μL	
	6 孔	200 μL	
推荐每孔细胞数（Opti-MEM）	96 孔	2×10 ⁵ ~3×10 ⁵ （20 μL）	
	48 孔	4×10 ⁵ ~6×10 ⁵ （40 μL）	
	24 孔	1×10 ⁶ ~1.5×10 ⁶ （100 μL）	
	12 孔	3×10 ⁶ ~4.5×10 ⁶ （300 μL）	
	6 孔	4×10 ⁶ ~6×10 ⁶ （400 μL）	

数据分享

在转染 EGFP mRNA 后，可通过荧光显微镜和流式细胞术对 T 细胞转染后的细胞活力与转染效率进行分析。首先通过荧光显微镜对转染后 T 细胞的 EGFP 蛋白质表达、细胞形态和活力进行定性评估（图 1）。同时，收集转染后的细胞进行流式检测以定量分析其转染效率。细胞收集完成后，离心弃去培养基，用 $1 \times$ DPBS 重悬细胞，进行流式检测（图 2）。

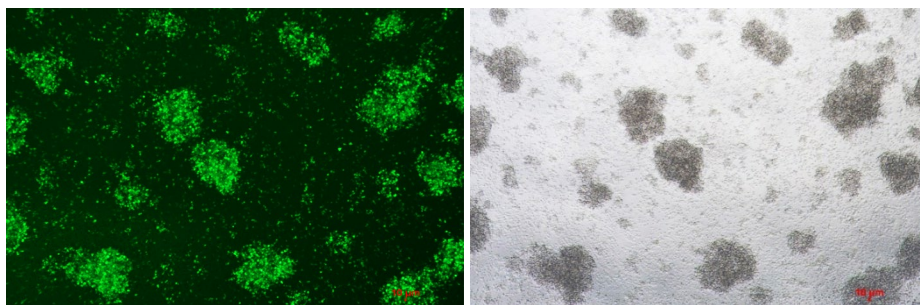


图 1. EGFP mRNA 在小鼠原代 T 细胞中的表达检测。荧光图（左）和明场图（右）显示，ProteanFect Max 小鼠原代免疫细胞转染试剂转染小鼠原代 T 细胞 1 天后，细胞成团生长，提示转染后细胞活率较高，增殖不受转染影响。绝大部分细胞表达绿色荧光蛋白，表明 ProteanFect Max 小鼠原代免疫细胞转染试剂盒在小鼠原代 T 细胞中具有较高的转染效率。

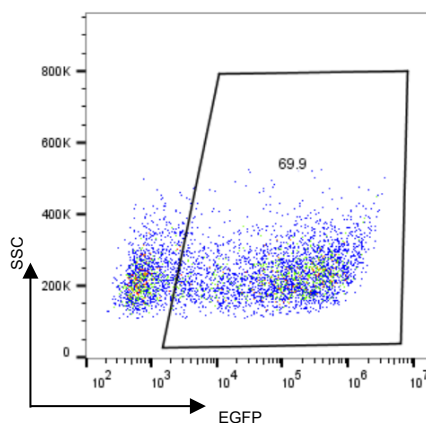


图 2. EGFP mRNA 在小鼠原代 T 细胞中表达的流式检测结果。小鼠原代 T 细胞磁珠激活第 3 天使用 ProteanFect Max 小鼠原代免疫细胞转染试剂转染 EGFP mRNA，在转染后 24 小时检测到约有 69.9% 细胞表达 EGFP 蛋白。

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 45 分钟。

2. 质粒 DNA 能否用于原代小鼠 T 细胞转染

双链 DNA 在原代细胞中的转染可能引发一定程度的毒性反应，如炎症应激等。以小鼠原代 T 细胞为例，使用质粒 DNA 转染可能导致显著的细胞毒性，因此不建议在此类细胞中进行质粒 DNA 的转染操作。

3. 原代 T 细胞转染前预处理

小鼠原代 T 细胞可使用 CD3/CD28 磁珠或抗体包被进行激活，激活 2-4 天内均可转染。可根据实验结果选择最佳转染时间。未激活的小鼠原代 T 细胞转染效率较低。（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→鼠原代 T）。

4. 关于试剂盒中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。

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，在离心管进行转染孵育，转染体系参照表 4，不会影响转染效率。

9. 贴壁细胞如何转染

ProteanFect Max 小鼠原代免疫细胞转染试剂盒使用说明书

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：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。

