

CRISPR-Fectin™ 转染试剂

高效转染 Cas9-sgRNA 复合物到哺乳动物细胞

产品编号: EF015 / EF016

包装规格: 1 mL / 3 mL

储存条件: 4℃~8℃密闭保存, 可保持稳定至少 12 个月, 常温运输。

■ 产品概述

CRISPR-Fectin™ 转染试剂是一款优化的脂质体转染为原理的转染试剂, 它能与 Cas9-sgRNA 核蛋白形成复合物, 并使该复合物进入哺乳动物细胞。**CRISPR-Fectin™** 转染试剂广泛适用于常见细胞系。即使在有血清存在的情况下, 该试剂仍能高效将 Cas9-sgRNA 复合物导入细胞。

GeneCopoeia 公司提供的 **CRISPR-Fectin™** 转染试剂具有如下优点:

- 相比其他转染试剂, 如 Lipofectamine®2000 和 Lipofectamine™ CRISPRMAX 对常见细胞系具有更高效的转染效率
- 细胞毒性低
- 转染前不需去除细胞培养液或血清
- 转染后不需清洗细胞
- 适用于转染 Cas9-sgRNA 复合物到哺乳动物细胞

■ 质量控制

每批次 **CRISPR-Fectin™** 转染试剂均经过转染测试。将 GeneHero™ Cas9 nuclease (GE001/GE002) 与合成的 sgRNA (靶向 HUWE 基因) 用 **CRISPR-Fectin™** 转染试剂转入 50% 融合度的 HEK-293 细胞, 转染 72 小时后, T7E1 实验检测非同源末端重组 (NHEJ) 产生的插入或缺失情况。

■ 注意事项

保证细胞状态: 请使用适当保存和经常传代的健康细胞, 并确保培养基无细菌、真菌或支原体污染。如果细胞是近期复苏的液氮冻存细胞, 请在转染前至少传代两次。

■ 实验材料

- **CRISPR-Fectin™** 转染试剂
- 无蛋白细胞培养液 (如 Opti-MEM I™, 来自 Life Technologies, 货号: 31985-088)
- 带核定位信号 NLS 的 Cas9 蛋白, 合成的 sgRNA
- Rnase-free 管和枪头等

■ 实验方法

第 0 天: 细胞培养和铺板

请使用适当保存和经常传代的健康细胞, 并确保培养基无细菌、真菌或支原体污染。如果细胞是近期复苏的液氮冻存细胞, 请在转染前至少传代两次。在进行转染前, 可参考表 1 进行细胞铺板。

注意: 不含抗生素。

	6-well	24-well	96-well
细胞数/孔	~6 x 10 ⁵ cells	~1 x 10 ⁵ cells	~2.5 x 10 ⁴ cells
培养基/孔	2 ml	0.5 ml	100 µl

表 1. 转染时细胞的数量

第 1 天：细胞转染

转染时确认每孔细胞融合度达 30%~50%（如表 1 推荐的细胞数量）。

1. 准备 Cas9-sgRNA 复合物

在冰上溶解 Cas9 蛋白和合成的 sgRNA。使用合适的 buffer 稀释 Cas9 蛋白至所需浓度。使用无核酸酶水稀释 sgRNA。

1a. 按表 2 建议，取 EP 管将 Cas9 蛋白和 sgRNA 混合到 Opti-MEM™ I 无蛋白培养液中，用枪头混匀，避免产生气泡。

	6-well	24-well	96-well
sgRNA	32.5 pmol	6.5 pmol	1.3 pmol
Cas9 Nuclease	4000 ng (25 pmol)	800 ng (5 pmol)	160 ng (1 pmol)
Opti-MEM™ I Medium	125 µl	25 µl	5 µl

表 2.

1b. 室温孵育 5 分钟。

2. 转染目的细胞

2a. 按表 3 建议，取 EP 管将 CRISPR-Fectin™ 转染试剂加入到 Opti-MEM™ I 中。用枪头混匀，避免产生气泡。

	6-well	24-well	96-well
CRISPR-Fectin™	7.5 µl	1.5 µl	0.3 µl
Opti-MEM™ I Medium	125 µl	25 µl	5 µl

表 3.

2b. 室温孵育 1 分钟。

2c. 将 CRISPR-Fectin™ 转染试剂溶液加入 Cas9-sgRNA 复合物中，用枪头混匀，避免产生气泡。

2d. 室温孵育 15-20 分钟，注意不要超过 30 分钟。

2e. 按表 4 建议，将 CRISPR-Fectin™ 转染试剂/Cas9-sgRNA 复合物加入细胞，向培养板孔中逐滴添加 DNA-EndoFectin™ 复合物，在滴加过程中轻柔晃动培养板/培养皿，使转染试剂均匀扩散。请避免将转染试剂重复滴加在同一位置（易使局部转染试剂浓度过高）。

	6-well	24-well	96-well
Cas9-sgRNA/CRISPR-Fectin™ mixture	250 µl	50 µl	10 µl

表 4.

2f. 在 CO₂ 培养箱中以 37℃ 继续培养细胞，2-3 天后进行检测，由于不同目的基因和目的细胞之间存在差异，可进一步摸索并确定最适合的检测时间。

该产品仅限于实验科学研究用，若有任何单位或个人将该产品用于临床诊断、治疗等其他国家专门规定的特殊用途，本公司概不承担任何责任。