

# CRISPR基因敲除& 敲入操作指南

HEK 293T/293 细胞的 CRISPR 基因敲除/敲入操作指南 --Thermo Fisher Neon™ 转染平台 .....	01
Jurkat 细胞的 CRISPR 基因敲除/敲入操作指南 --Thermo Fisher Neon™ 转染平台 .....	08
激活的人源 T 细胞的 CRISPR 基因敲除/敲入操作指南 --Lonza 4D-Nucleofector™ X Unit 电转平台 .....	15

# HEK 293T/293 细胞的 CRISPR 基因敲除/敲入操作指南

## (Thermo Fisher Neon™ 转染平台)

### 1. 实验材料

- Neon™ 转染平台 (Thermo Fisher, MPK5000)。包含以下仪器与耗材：Neon™ 转染仪、Neon™ 移液器、Neon™ 移液器架。
- Neon™ 转染试剂盒-10 μL 体系 (MPK1096)，开封前室温保存，首次使用后，将缓冲液储存于 4°C 冰箱。试剂盒中包含以下试剂与耗材：
  - 3×1 ml 重悬缓冲液 R
  - 2×150 ml 电解缓冲液 E
  - 96×10 μl Neon™ 吸头
  - 20 个 Neon™ 电穿孔管
- DMEM 培养基 (Gibco, 10569010)
- FBS (LIFE, 10091148)
- 胰蛋白酶-EDTA (0.25%)，酚红 (Gibco, 25200072)
- DPBS (不含 Ca<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>)：(LIFE, 10099141)
- Cas9 蛋白：eSpCas9-N-NLS 核酸酶 (金斯瑞, Z03470-300)
- sgRNA：EasyEdit sgRNA / SafeEdit sgRNA (金斯瑞, SC1969/SC1968)
- HDR 模板 (HDRT)：GenWand™ dsDNA (金斯瑞, SC2999) -用于基因敲入实验
- 培养皿：10 cm 细胞培养皿 (Corning, 430167)
- 12 孔细胞培养板 (Corning, 3513)

### 2. 电转前的准备

- 细胞培养
  - ①. 每 2-3 天更换一次培养基。
  - ②. 当细胞汇合度为 80-90%时，进行细胞传代。
  - ③. 细胞铺板浓度：2 × 10<sup>5</sup> 个细胞/ml。
  - ④. 电转前 1-2 天进行细胞传代。

**注意：**一般情况下，建议使用传代数尽量低的细胞，不建议使用传代 20 代后的 HEK-293T/293 细胞进行电转。细胞汇合度达 60-80%时，电转效率较好，细胞密度过高可能会导致电转效率降低。

### ○ 胰蛋白酶消化

- ①. 弃掉细胞培养基，用 DPBS 清洗细胞一次。
- ②. 培养皿中加入 1-2 ml 胰蛋白酶-EDTA，37°C 与细胞共孵育 1-2 分钟。  
**注意：**使用前，胰蛋白酶-EDTA 应提前平衡至室温，否则需要延长消化时间。
- ③. 当 >90% 的细胞被消化并悬浮起来，立即加入培养基终止消化反应。  
**注意：**胰蛋白酶消化不完全或过度会影响细胞状态，最终影响电转。

### ○ RNP 和 HDRT 工作溶液制备与储存

- ①. 将冻干粉状的 EasyEdit sgRNA/ SafeEdit sgRNA 溶解在 RNase-/DNase-free 且无热原的水中，或 RNase-/DNase-free 1× TE 缓冲液中，终浓度为 100 μM (100 pmol/μl)。溶解后等分为 5-10 μl/管，放在 -20°C 短期储存，或放在 -80°C 长期储存。  
**注意：**推荐使用水进行溶解，以避免对电转缓冲体系产生不确定的影响。
- ②. Cas9 蛋白：按产品标注浓度进行贮存即可，-20°C 储存。
- ③. 将冻干粉末的 dsDNA HDRT 溶解在 RNase-/DNase-free 且无热原的水中，终浓度为 2 μg/μl，-20°C 储存。

## 3. 电转实验流程

### ○ 设置 Neon™ 移液器和移液器架

- ①. 确保 Neon™ 移液器和移液器架连接至 Neon™ 转染仪。
- ②. 将 3 ml 电解缓冲液 E 加入 Neon™ 电穿孔管，10 μL Neon™ 吸头配套使用电解缓冲液 E。  
**注意：**确保 Neon™ 电穿孔管侧面的电极完全浸入缓冲液中。100 ul Neon 吸头配套的是电解缓冲液 E2，注意不要混用。
- ③. 将 Neon™ 电穿孔管插入 Neon™ 移液器架，直至听到咔嚓声。  
**注意：**确保 Neon™ 电穿孔管的电极一侧与 Neon™ 移液器架的侧壁上的活塞球连接良好。

### ○ 准备 HEK293T 细胞

- ①. 预先计算，并培养所需数量的细胞。
- ②. 将含有血清的培养基、DPBS、胰蛋白酶-EDTA 溶液放置至室温。
- ③. 准备 12 孔细胞培养板，每孔加入 1 ml 含 10% FBS 的培养基（不含抗生素），在 37°C / 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中预先孵育。

- ④. 电转前一天，将细胞传代转移到一个新的 10 cm 细胞培养皿中，加入新鲜的生长培养基，确保细胞在实验当天约为 60-80% 的汇合度。
- ⑤. 从培养皿中吸出并弃掉培养基，用 DPBS 清洗细胞。
- ⑥. 胰蛋白酶-EDTA 消化细胞。
- ⑦. 将消化下来的细胞悬液转移至 15 ml 离心管中，室温下以 1,000 转/分钟，离心 5 分钟。  
**注意：**避免高速离心，轻轻用移液枪吹散细胞，有助于保证细胞状态良好。
- ⑧. 弃掉上清，将细胞重悬在 DPBS 中。
- ⑨. 取出少许重悬细胞溶液，用台盼蓝染色法计数细胞，计算细胞密度。
- ⑩. 将所需数量的细胞 ( $2 \times 10^5$  个细胞/样品) 转移到 15 ml 离心管中，在室温下以 1,000 转/分钟，离心 5 分钟。
- ⑪. 吸出并弃掉 DPBS，使用重悬缓冲液 R 重悬细胞，最终浓度为  $4 \times 10^7$  个细胞/ml (置于 Tube 1)。轻轻用移液器吹打细胞，获得细胞悬液。根据优化实验结果，保证  $2 \times 10^5$  个细胞/样品，电转效果较好。

**注意：**尽量在避免细胞丢失的前提下将上清去除干净。重悬、混匀或转移细胞时，尽可能频繁/温和的吹打细胞悬液，防止细胞沉降。快速、谨慎的操作，避免将细胞悬液在室温储存超过 15-20 分钟，从而避免细胞活力降低，影响转染效率。重悬细胞密度也可根据电转设备操作指南或优化实验流程调整。细胞制备步骤可以在 CRISPR 试剂孵育时，合理安排穿插进行。

## ○ 电转流程

- ①. 将重悬缓冲液 R 平衡至室温 (开封后的缓冲液放至 4°C 储存)。
- ②. 在无菌、DNase/RNase-free 的 1.5 ml 离心管 (Tube 2, 总体积为 7  $\mu$ l) 中按照下表添加量加入重悬缓冲液 R、sgRNA 和 Cas9 蛋白，充分混匀后，在室温下孵育 10 分钟以形成 RNP 混合物。然后将表中需要的量的 HDRT 加入混合物中，确保轻轻混合，并在室温下孵育 2 分钟左右。

加样顺序	Tube 2 试剂	加样量 / 样品
1	重悬缓冲液 R	加至总体积 7 $\mu$ l
2	sgRNA	22.5 pmol
3	Cas9 蛋白	7.5 pmol
室温孵育 10 分钟		
4	HDRT	2 $\mu$ g (dsDNA)
室温孵育 2 分钟		

**注意：**确保 RNP 混合时 Cas9 蛋白是最后一个添加的。针对基因敲除实验，不需要添加 HDRT。表中 Cas9 与 sgRNA 的比例为 1:3，对于 0.5-4.0 kb 长度范围的 dsDNA，HDRT 加入量建议为 2  $\mu\text{g}$ 。针对具体实验，建议进行优化预实验，以确定最佳 Cas9:sgRNA 比例、Cas9 蛋白和 HDRT 的加入量。建议优化预实验中，Cas9:sgRNA 的比例可以设置在 1:1 到 1:4 之间；建议 dsDNA 的加入量设置在 0.5  $\mu\text{g}$ -3  $\mu\text{g}$  之间（该数值基于 HDRT 的长度在 0.5 kb 到 4.0 kb 之间，如果超出范围，可能需要适当调整加入量）。第一次实验建议分别设置阴性对照（Cas9 蛋白与无靶标的 sgRNA 或无 sgRNA）、阳性对照（选择已验证的高效的基因敲入体系）和转染对照（GFP 表达质粒，确保转染的稳定性）。

- ③. 从 Tube 1 中取 5  $\mu\text{l}$  细胞悬液（即  $2 \times 10^5$  个细胞）加入 RNP 和 HDRT 混合物中（Tube 2），用移液器快速轻柔吹匀，混合物总体积约为 12  $\mu\text{l}$ 。
- ④. 然后按下 Neon™ 移液器按钮至第二档，移液器抓取吸头的夹子打开，将 Neon™ 移液器的头部插入 Neon™ 吸头，直到夹子完全抓住吸头内部的活塞电极杆的安装部分，轻轻松开按钮，继续向下按压移液器，确认两者间没有任何间隙。
- ⑤. 按下 Neon™ 移液器按钮至第一档，将 Neon™ 吸头浸入细胞和 RNP & HDRT 的混合物中，松开按钮，吸取样品。将含有样品的 Neon™ 移液器，垂直插入 Neon™ 移液器架中的 Neon™ 电穿孔管中，直至听到咔嚓声即可。

**注意：**在移液过程中避免气泡，因为气泡会在电转过程中引起电火花。如果发现吸头里有气泡，则丢弃样品，并小心地将新鲜样品再次吸入吸头，避免气泡。

- ⑥. 启动 Neon™ 转染仪，设置合适的电穿孔参数（对于 HEK293T 细胞——电压：1200V；时间：10ms；脉冲：3 个脉冲）。

**注意：**此程序已优化。如有必要，您可以根据设备说明书优化电转程序，以提高电转效率。

- ⑦. 确定已选择适当的电转程序，并按下触摸屏上的 **Start**。
- ⑧. 在开始传递电脉冲之前，Neon™ 转染仪会自动检查 Neon™ 电穿孔管和 Neon™ 移液器是否正确插好。触屏显示 **Complete**，表示电穿孔流程已完成。
- ⑨. 缓慢地将 Neon™ 移液器从 Neon™ 移液工作站移除，轻轻将 Neon™ 移液器的按钮按至第一档，将完成电穿孔的样品转移至预先准备好的 12 孔细胞培养板中，一个样品放入一个孔中。

**注意：**避免重复吹打和混合。

- ⑩. 将 Neon™ 吸头丢弃到适当的生物危害垃圾容器中。

- ⑪ 轻轻摇动 12 孔板，确保细胞均匀分布。在 37°C 的加湿 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养细胞。
- ⑫ 如果您不再使用 Neon™ 设备，请将后部的电源开关调整到 OFF。

#### 4. 电转后细胞培养与分析

- ①. 在 37°C / 5% CO<sub>2</sub> 加湿培养箱中培养细胞，直至开展分析实验。建议当细胞恢复至 70-100% 汇合度后，再进行后续检测。
- ②. 培养 3 天后，可进行基因敲除结果分析；为避免可能存在的背景信号的影响，敲入效率的分析建议检测时间延长至 5-7 天。

#### 5. 故障排除指南

问题	潜在原因	建议的解决方案
电弧（火花）	Neon™ 吸头中有气泡	吸入样品时，避免 Neon™ 吸头中出现任何气泡。
	电压过高或脉冲持续时间过长	降低电压或脉冲持续时间参数设置。
	使用乙醇或者异丙醇沉淀法制备的 DNA	建议尽量避免使用乙醇或者异丙醇沉淀 DNA 方法来浓缩 DNA，因为该方法存在的盐污染可能会引起电火花。
细胞培养板上没有细胞	在细胞吹打或弃掉上清的过程中，细胞损失，未进入电穿孔程序。	弃掉细胞样品上清液时要小心，避免细胞损失。
不同样品之间，细胞分布差异显著	细胞悬液的分布不均匀	轻柔并充分的混匀细胞悬液，然后再加入到 RNP 和 HDRT 混合物试剂中，注意持续轻柔的晃动混合悬液从而避免细胞沉降。 使用同一个批次处理的细胞，应用于同一次实验的不同组别。
	细胞培养皿中细胞分布不均	轻轻拍打细胞培养板的侧壁，使细胞均匀分布。
细胞存活率低	待转入的 DNA 质量差	使用高质量、低内毒素 (<10 EU/mg) 和适当浓度 (1-3 μg/μl) 的 DNA。

	过量的 HDRT 造成内源性的免疫反应	设置一系列从高到低的 HDRT 浓度进行预实验测试，选择合适的剂量用于电转，兼顾细胞活力和编辑效率。
	细胞培养条件不合适	用于电穿孔的细胞，传代的代数不宜超过 20 代。 电穿孔前 1 天，以 $2-4 \times 10^5$ 个细胞/ml 的浓度铺板。避免使用高密度铺板的细胞，防止影响电穿孔后的细胞存活率。
	细胞状态差、受到损伤	在细胞培养与收集过程中避免高速离心等损伤性操作，轻柔的吹匀与转移细胞。避免将细胞置于重悬缓冲液 R 中超过 20 分钟。 电转后，立即将细胞转移至预热的培养基中。
	细胞数量不正确	确保 $2 \times 10^5$ 个细胞/样品，细胞数 $>3 \times 10^5$ 或 $<1 \times 10^5$ 的细胞会显著降低电转后的细胞活力。
	重复使用 Neon™吸头	不要重复使用 Neon™吸头超过 2 次，重复使用过程中电脉冲会损伤吸头质量、破坏其物理完整性。
基因敲除或敲入效率低，电转效率无法重复	操作流程问题	建议进行优化预实验，测试关键试剂的剂量范围或比例，以找到更合适的方案。
	细胞状态欠佳	避免使用融合度过高 ( $>90\%$ ) 的细胞。
	待转入的 DNA 降解	DNA 在 $-20^\circ\text{C}$ 下储存不超过 1 年，使用前充分混匀并测定浓度。
	待转入的 sgRNA 降解	将 sgRNA 分成 5-10 $\mu\text{l}$ /管， $-20^\circ\text{C}$ 最多储存 6 个月， $-80^\circ\text{C}$ 最多储存 1 年。 避免反复冻融超过 10 次。
	Cas9 蛋白降解或失活	在有效期内使用 Cas9 蛋白，避免储存时间超过 6 个月。避免反复将 Cas9 从冰箱中取出。 将 Cas9 分为 20 $\mu\text{l}$ /管， $-20^\circ\text{C}$ 储存。储存

		体积必须大于 10 $\mu$ l, 避免 Cas9 活性降低。
	细胞数量不正确	每个样本的细胞数 $>3\times 10^5$ 或 $<5\times 10^4$ 会显著降低转染效率。 建议 10 $\mu$ l 体系里, 每个样品含 $2\times 10^5$ 个细胞。
	电穿孔过程中的火花	避免 Neon™ 吸头出现气泡。 使用合适的电穿孔程序。 不要使用乙醇或者异丙醇沉淀 DNA 的方法用于浓缩 DNA。
	支原体污染细胞	检测细胞是否存在支原体污染。存在污染则需使用其他库存细胞开展新一轮的细胞培养。
	分析方法不当	检查检测和分析方法的合理性及操作的严谨性, 必要时改变分析方法。

### 金斯瑞 CRISPR 相关服务

- **EasyEdit sgRNA:** 筛选阶段-细胞毒性低、编辑效率高、更稳定、更快更经济、即买即用
- **SafeEdit sgRNA:** 验证阶段-细胞毒性低、编辑效率高、更稳定、HPLC 纯化、定制化 QC
- **GenWand™ dsDNA:** 2-10 kb 长基因敲入、 $\mu$ g-g 交付量、双端共价封闭, 敲入效率高, 提供科研至临床前研究级



# Jurkat 细胞的 CRISPR 基因敲除/敲入操作指南

## (Thermo Fisher Neon™ 转染平台)

### 1. 实验材料

- Neon™ 转染平台 (Thermo Fisher, MPK5000)。包含以下仪器与耗材：Neon™ 转染仪、Neon™ 移液器、Neon™ 移液器架。
- Neon™ 转染试剂盒-10 μL 体系 (MPK1096)，开封前室温保存，首次使用后，将缓冲液储存于 4°C 冰箱。试剂盒中包含以下试剂与耗材：
  - 3×1 ml 重悬缓冲液 R
  - 2×150 ml 电解缓冲液 E
  - 96×10 μl Neon™ 吸头
  - 20 个 Neon™ 电穿孔管
- RPMI 1640 培养基 (Gibco, 22400089)
- FBS (LIFE, 10091148)
- DPBS (不含 Ca<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>) (LIFE, 14190-144)
- Cas9 蛋白: eSpCas9-N-NLS 核酸酶 (金斯瑞, Z03470-300)
- sgRNA: EasyEdit sgRNA / SafeEdit sgRNA (金斯瑞, SC1969/SC1968)
- HDR 模板 (HDRT): dsDNA (金斯瑞, SC2999) -用于基因敲入实验
- 培养皿: 10 cm 细胞培养皿 (Corning, 430167)
- 24 孔细胞培养板 (Corning, 3524)

### 2. 电转前的准备

- 细胞培养
  - ①. 每 2-3 天更换一次培养基。
  - ②. 每周细胞传代 2-3 次。推荐细胞传代培养比例为 1:5 - 1:6。
  - ③. 培养过程中保持细胞密度在  $2 \times 10^5$  -  $1.5 \times 10^6$  个细胞/ml。
  - ④. 电转前 1 天对 Jurkat 细胞传代，调整细胞密度为  $2 \times 10^5$  -  $4 \times 10^5$  个细胞/ml。

**注意：**一般情况下，电转前 1 天的传代可根据实验所需细胞数量进行铺板，传代细胞密度不可过高，以保证良好的细胞状态，建议使用传代数尽量低的细胞，不建议使用传代 20 代后的细胞进行电转。

- RNP 和 HDRT 工作溶液制备与储存

- ①. 将冻干粉状的 EasyEdit sgRNA/ SafeEdit sgRNA 溶解在 RNase-/DNase-free 且无热原的水中，或 RNase-/DNase-free 1×TE 缓冲液中，终浓度为 100 μM (100 pmol/μl)。溶解后等分为 5-10 μl/管，放在 -20°C 短期储存，或放在 -80°C 长期储存。

**注意：**推荐使用水进行溶解，以避免对电转缓冲体系产生不确定的影响。

- ②. Cas9 蛋白：按产品标注浓度进行贮存即可，-20°C 储存。
- ③. 将冻干粉末的 dsDNA HDRT 溶解在 RNase-/DNase-free 且无热原的水中，终浓度为 2 μg/μl，-20°C 储存。

### 3. 电转实验流程

#### ○ 设置 Neon™ 移液器和移液器架

- ①. 确保 Neon™ 移液器和移液器架连接至 Neon™ 转染仪。
- ②. 将 3 ml 电解缓冲液 E 加入 Neon™ 电穿孔管，10 μL Neon™ 吸头配套使用电解缓冲液 E。

**注意：**确保 Neon™ 电穿孔管侧面的电极完全浸入缓冲液中。100 ul Neon 吸头配套的是电解缓冲液 E2，注意不要混用。

- ③. 将 Neon™ 电穿孔管插入 Neon™ 移液器架，直至听到咔嚓声。

**注意：**确保 Neon™ 电穿孔管的电极一侧与 Neon™ 移液器架的侧壁上的活塞球连接良好。

#### ○ 准备 Jurkat 细胞

- ①. 预先计算，并培养所需数量的细胞。
- ②. 准备 24 孔细胞培养板，根据需要的孔数，每孔加入 0.5 ml 含 10% FBS 的 1640 培养基（不含抗生素），在 37°C / 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中预先孵育。
- ③. 观察细胞状态，确保状态良好。将细胞转移到 15mL 离心管中，1,000 转/分钟，离心 5 分钟，收获细胞。
- ④. 弃掉上清，将细胞重悬在 DPBS 中。
- ⑤. 取出少许重悬细胞溶液，用台盼蓝染色法计数细胞，计算细胞密度。
- ⑥. 将所需数量的细胞（5×10<sup>5</sup> 个细胞/个样品）转移到 15 ml 离心管中，在室温下以 1,000 转/分钟离心 5 分钟。

**注意：**避免高速离心，轻轻用移液枪吹散细胞，有助于保证细胞状态良好。

- ⑦. 吸出并弃掉 DPBS，使用重悬缓冲液 R 重悬细胞，最终浓度为 1×10<sup>8</sup> 个细胞/ml（置于 Tube 1）。

**注意：**尽量在避免细胞丢失的前提下将上清去除干净。重悬、混匀或转移细胞时，尽可能频繁/温和的吹打细胞悬液，防止细胞沉降。快速、谨慎的操作，避免将细胞悬液在室温储存超过 15-20 分钟，从而避免细胞活力降低，并影响转染效率。重悬细胞密度也可根据电转设备操作指南或优化实验流程调整。细胞制备步骤可以在 CRISPR 试剂孵育时，合理安排穿插进行。

## ○ 电转流程

- ①. 将重悬缓冲液 R 平衡至室温（开封后的缓冲液放至 4℃ 储存）。
- ②. 在无菌、DNase/RNase-free 的 1.5 ml 离心管（Tube 2，总体积为 7 μl）中按照下表添加量加入重悬缓冲液 R、sgRNA 和 Cas9 蛋白，充分混匀后，在室温下孵育 10 分钟以形成 RNP 混合物。然后将表中需要的量的 HDRT 加入混合物中，确保轻轻混合，并在室温下孵育 2 分钟左右。

加样顺序	Tube 2 试剂	加样量 / 样品
1	重悬缓冲液 R	加至总体积 7 μl
2	sgRNA	22.5 pmol
3	Cas9 蛋白	7.5 pmol
室温孵育 10 分钟		
4	HDRT	1 μg (dsDNA)
室温孵育 2 分钟		

**注意：**确保 RNP 混合时 Cas9 蛋白是最后一个添加的。针对基因敲除实验，不需要添加 HDRT。表中 Cas9 与 sgRNA 的比例为 1:3，对于 0.5-4.0 kb 长度范围的 dsDNA，HDRT 加入量建议为 1 μg（Jurkat 细胞对核酸较敏感，HDRT 适用量会低于在 HEK293T 细胞的中）。针对具体实验，建议进行优化预实验，以确定最佳 Cas9:sgRNA 比例、Cas9 蛋白和 HDRT 的加入量。建议优化预实验中，Cas9:sgRNA 的比例可以设置在 1:1 到 1:4 之间；建议 dsDNA 的加入量设置在 0.5 μg-3 μg 之间（该数值基于 HDRT 的长度在 0.5 kb 到 4.0 kb 之间，如果超出范围，可能需要适当调整加入量）。第一次实验建议分别设置阴性对照（Cas9 蛋白与无靶标的 sgRNA 或无 sgRNA）、阳性对照（选择已验证的高效的基因敲入体系）和转染对照（GFP 表达质粒，确保转染的稳定性）。

- ③. 从 Tube 1 中取 5 μl 细胞悬液（即  $5 \times 10^5$  个细胞）加入 RNP 和 HDRT 混合物中（Tube 2）中，使用移液器快速轻柔吹匀，混合物总体积约为 12 μl。
- ④. 然后按下 Neon™ 移液器按钮至第二档，移液器抓取吸头的夹子打开，将 Neon™ 移液器的头部插入 Neon™ 吸头，直到夹子完全抓住吸头内部的活塞电极杆的安装部分，轻轻

松开按钮，继续向下按压移液器，确认两者间没有任何间隙。

- ⑤. 按下 Neon™ 移液器按钮至第一档，将 Neon™ 吸头浸入细胞和 RNP & HDRT 的混合物中，松开按钮，吸取样品。将含有样品的 Neon™ 移液器，垂直插入 Neon™ 移液器架中的 Neon™ 电穿孔管中，直至听到咔嗒声即可。

**注意：**在移液过程中避免气泡，因为气泡会在电转过程中引起电火花。如果发现吸头内有气泡，则丢弃样品，并小心地将新鲜样品再次吸入吸头，避免气泡。

- ⑥. 启动 Neon™ 转染仪，设置合适的电穿孔参数（对于 Jurkat 细胞—电压：1,700V；时间：20ms；脉冲：1 个脉冲）。

**注意：**此程序已优化。如有必要，您可以根据设备说明书优化电转程序，以提高电转效率。

- ⑦. 选择适当的电转程序，并按下触摸屏上的 **Start**。
- ⑧. 在开始传递电脉冲之前，Neon™ 转染仪会自动检查 Neon™ 电穿孔管和 Neon™ 移液器是否正确插好。触屏显示 **Complete**，表示电转流程已完成。
- ⑨. 缓慢地将 Neon™ 移液器从 Neon™ 移液工作站移除，轻轻将 Neon™ 移液器的按钮按至第一档，将完成电穿孔的样品转移至预先准备好的 12 孔细胞培养板中，一个样品放入一个孔中。

**注意：**避免重复吹打和混合。

- ⑩. 将 Neon™ 吸头丢弃到适当的生物危害垃圾容器中。
- ⑪. 轻轻摇动 24 孔板，确保细胞均匀分布。在 37°C 的加湿 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养细胞。
- ⑫. 如果您不再使用 Neon™ 设备，请将后部的电源开关调整到 OFF。

## 4. 电转后细胞培养与分析

- ①. 在 37°C / 5% CO<sub>2</sub> 加湿培养箱中培养细胞，直至开展分析实验。当细胞密度生长至 1-1.5 × 10<sup>6</sup> 个细胞/ml 时，即可进行检测。电转完成后，每 2-3 天，需要额外一些培养基，保证细胞密度在 2 × 10<sup>5</sup> - 2 × 10<sup>6</sup> 个细胞/ml。
- ②. 培养 3 天后，可进行基因敲除结果分析；为避免可能存在的背景信号的影响，敲入效率的分析建议检测时间延长至 5-7 天。

## 5. 故障排除指南

问题	潜在原因	建议的解决方案
----	------	---------

电弧 (火花)	Neon™吸头中有气泡	吸入样品时, 避免 Neon™吸头中出现任何气泡。
	电压过高或脉冲持续时间过长	降低电压或脉冲持续时间参数设置。
	使用乙醇或者异丙醇沉淀法制备的 DNA	建议尽量避免使用乙醇或者异丙醇沉淀 DNA 方法来浓缩 DNA, 因为该方法存在的盐污染可能会引起电火花。
细胞培养板上没有细胞	在细胞吹打或弃掉上清的过程中, 细胞损失, 未进入电穿孔程序。	弃掉细胞样品上清液时要小心, 避免细胞损失。
不同样品之间, 细胞分布差异显著	细胞悬液的分布不均匀	轻柔并充分的混匀细胞悬液, 然后再加入到 RNP 和 HDRT 混合物试剂中, 注意持续轻柔的晃动混合悬液从而避免细胞沉降。 使用同一个批次处理的细胞, 应用于同一次实验的不同组别。
	细胞培养皿中细胞分布不均	轻轻拍打细胞培养板的侧壁, 使细胞均匀分布。
细胞存活率低	待转入的 DNA 质量差	使用高质量、低内毒素 (<10 EU/mg) 和适当浓度 (1-3 μg/μl) 的 DNA。
	过量的 HDRT 造成内源性的免疫反应	设置一系列从高到低的 HDRT 浓度进行预实验测试, 选择合适的剂量用于电转, 兼顾细胞活力和编辑效率。
	细胞培养条件不合适	用于电穿孔的细胞, 传代的代数不宜超过 20 代。 电穿孔前 1 天, 以 2-4×10 <sup>5</sup> 个细胞/ml 的浓度铺板。避免使用高密度铺板的细胞, 避免影响电穿孔后的细胞存活率。
	细胞状态差、受到损伤	在细胞培养与收集过程中避免高速离心等损伤性操作, 轻柔的吹匀与转移细胞。 避免将细胞置于重悬缓冲液 R 中超过 20

		分钟。 电转后，立即将细胞转移至预热的培养基中。
	细胞数量不正确	确保 $5 \times 10^5$ 个细胞/样品，细胞数 $> 7 \times 10^5$ 或 $< 1 \times 10^5$ 的细胞会显著降低电穿孔后的细胞活力。
	重复使用 Neon™吸头	不要重复使用 Neon™吸头超过 2 次，重复使用过程中电脉冲会损伤吸头质量、破坏其物理完整性。
基因敲除或敲入效率低，电转效率无法重复	操作流程问题	建议进行优化预实验，测试关键试剂的剂量范围或比例，以找到更合适的方案。
	细胞状态欠佳	避免使用铺板密度过高 ( $> 4 \times 10^5$ ) 的细胞。
	待转入的 DNA 降解	DNA 在 $-20^\circ\text{C}$ 下储存不超过 1 年，使用前充分混匀并测定浓度。
	待转入的 sgRNA 降解	将 sgRNA 分成 5-10 $\mu\text{l}$ /管， $-20^\circ\text{C}$ 最多储存 6 个月， $-80^\circ\text{C}$ 最多储存 1 年。 避免反复冻融超过 10 次。
	Cas9 蛋白降解或失活	在有效期内使用 Cas9 蛋白，避免储存时间超过 6 个月。避免反复将 Cas9 从冰箱中取出。 将 Cas9 分为 20 $\mu\text{l}$ /管， $-20^\circ\text{C}$ 储存。储存体积必须大于 10 $\mu\text{l}$ ，避免 Cas9 活性降低。
	细胞数量不正确	每个样本的细胞数 $> 5 \times 10^5$ 或 $< 1 \times 10^5$ 会显著降低转染效率。 建议 10 $\mu\text{l}$ 体系里，每个样品含 $5 \times 10^5$ 个细胞。
	电穿孔过程中的火花	避免 Neon™ 吸头出现气泡。 使用合适的电穿孔程序。 不要使用乙醇或者异丙醇沉淀 DNA 的方法用于浓缩 DNA。
	支原体污染细胞	检测细胞是否存在支原体污染。存在污染则需使用其他库存细胞开展新一轮的细

		胞培养。
	分析方法不当	检查检测和分析方法的合理性及操作的严谨性，必要时改变分析方法。

### 金斯瑞 CRISPR 相关服务

- **EasyEdit sgRNA:** 筛选阶段-细胞毒性低、编辑效率高、更稳定、更快更经济、即买即用
- **SafeEdit sgRNA:** 验证阶段-细胞毒性低、编辑效率高、更稳定、HPLC 纯化、定制化 QC
- **GenWand™ dsDNA:** 2-10 kb 长基因敲入、 $\mu\text{g-g}$  交付量、双端共价封闭，敲入效率高，提供科研至临床前研究级

## 激活的人源 T 细胞的 CRISPR 基因敲除/敲入操作指南 (Lonza 4D-Nucleofector™ X Unit 电转平台)

### 6. 实验材料

- 4D-Nucleofector™电转仪：4D-Nucleofector™ Core Unit + 4D-Nucleofector™ X Unit
- P3 原代细胞 4D-Nucleofector™ X 试剂盒 (Lonza, V4XP-3032)。试剂盒组分如下：
  - 2 个 20 µl 16 孔 Nucleocuvette™电转板条
  - 0.675 ml Nucleofector™电转溶液
  - 0.15 ml 补充溶液
  - 50 µg pmaxGFP™ 阳参质粒
- PBMCs (ALLCELLS, LP, CR, MNC, 100M)
- Dynabeads™ Untouched™ Human T Cells Kit (ThermoFisher, 11344D)
- T Cell TransAct™, human (Miltenyi Biotec, 130-110-160)
- Human IL-2 IS, premium grade (Miltenyi Biotec, 130-097-745), IL7 (ThermoFisher, PHC0075), IL15 (ThermoFisher, PHC9154)
- X-VIVO™ 15 Serum-free Hematopoietic Cell Medium (Lonza, BE02-053Q)
- FBS (LIFE, 10099-141C)
- DPBS (LIFE, 14190-144)
- DynaMag™-2 磁力架 (ThermoFisher, 12321D)
- Cas9 蛋白：eSpCas9-N-NLS 核酸酶 (金斯瑞, Z03470-300)
- sgRNA：EasyEdit sgRNA / SafeEdit sgRNA (金斯瑞, SC1969 / SC1968)
- HDR 模板 (HDRT)：ssDNA (金斯瑞, SC1999)-用于基因敲入实验
- 6 孔细胞培养板 (Corning, 3516)
- 48 孔细胞培养板 (Corning, 3548)

### 2. 电转前准备

- 人原代 T 细胞的培养和激活
  - ①. 复苏冻存的 PBMCs, 使用含有 5% FBS 的 X-VIVO™ 15 培养基 (添加 100 U/ml IL-2、5 ng/ml IL-7、5 ng/ml IL-15) 重悬, 调整细胞密度为  $1 \times 10^6$  个细胞/ml, 无需刺激, 置于 6 孔板中培养 1 天。

**注意:** 细胞密度过低或过高都会影响细胞状态的恢复, 推荐的培养细胞密度为  $1-2 \times 10^6$  个细胞/ml。对于 6 孔板, 推荐每孔培养基体积为 3 ml - 5 ml。



- ②. 使用 Dynabeads™ Untouched™ Human T Cells Kit 和 DynaMag™-2 磁力架对 T 细胞进行阴性分选，流程参考供应商操作手册，得到原代 T 细胞。
- ③. 细胞分选后，根据每  $1 \times 10^6$  个原代 T 细胞使用 10  $\mu$ l 的 T Cell TransAct™ 的加入量，添加 T Cell TransAct™ 对原代 T 细胞进行刺激。将细胞密度调整为  $1 \times 10^6$  个细胞/ml，在新的 6 孔板中继续培养。培养过程仍然需要添加 100 U/ml 的 IL-2、5 ng/ml 的 IL-7、5 ng/ml 的 IL-15。

**注意：**对于 6 孔板，推荐每孔培养基体积为 3 ml - 5 ml。

- ④. T 细胞激活培养 2 天后，进行 CRISPR 试剂的电转实验。

**注意：**不恰当的激活时间会在一定程度上影响电转后的细胞活力和编辑效率。

#### ○ 电转前原代人 T 细胞培养

电转前，T 细胞的培养在 6 孔板中进行，使用含 5% FBS 的 X-VIVO™ 15 培养基，培养基中添加 100 U/ml 的 IL-2、5 ng/ml 的 IL-7 和 5 ng/ml 的 IL-15，调整细胞初始培养密度为  $1 \times 10^6$  个细胞/ml。

#### ○ RNP 和 HDRT 工作溶液制备与储存

- ①. 将冻干粉状的 EasyEdit sgRNA/ SafeEdit sgRNA 溶解在 RNase-/DNase-free 且无热原的水中，终浓度为 100  $\mu$ M (100 pmol/ $\mu$ l)。溶解后等分为 5-10  $\mu$ l/管，放在 -20°C 短期储存，或放在 -80°C 长期储存。
- ②. Cas9 蛋白：按产品标注浓度进行贮存即可，-20°C 储存。
- ③. 将冻干粉末的 ssDNA HDRT 溶解在 RNase-/DNase-free 且无热原的水中，终浓度为 2  $\mu$ g/ $\mu$ l，-20°C 储存。

### 3. 电转实验流程

- ①. Nucleofector™ 电转溶液 (Nucleofector™ Solution) 和补充溶液 (Supplement) 按照 4.5:1 的比例混合制备 Lonza P3 电转缓冲液，混合后平衡至室温，每个反应需要 20  $\mu$ l 混合后的 P3 电转缓冲液。  
**注意：**混合后的 P3 电转液需要在 3 个月内用完。
- ②. 启动 4D-Nucleofector™ 电转仪，新建或者调用特定电转程序 (详细请参考 Lonza 4D-Nucleofector™ 电转仪使用指南)
- ③. 选择合适的电转程序，比如适用于 T 细胞电转的程序：EH115。

**注意：**该程序已经过优化。如有必要，您可以根据设备手册优化电转程序，以提高电转效果。

- ④. 在 48 孔板中，根据需要的孔数，每孔加入 700  $\mu\text{l}$  含 5% FBS 的 X-VIVO™ 15 培养基（含 200 U/ml 的 IL-2、5 ng/ml 的 IL-7、5 ng/ml 的 IL-15），将 48 孔板置于 37°C/5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中预热。另外，准备适当体积的不含细胞因子的 X-VIVO™ 15 培养基（每个电转反应需要 80  $\mu\text{l}$ ），在 37°C/5% CO<sub>2</sub> 培养箱中预热。

- ⑤. 通过 90 g 离心 10 分钟收集细胞，弃掉上清可去除 T 细胞培养液中多余的 T Cell TransAct™，从而获得激活后的 T 细胞，将细胞重悬于 DPBS 缓冲液中。

**注意：**避免高速离心，轻柔地吸取/吹打细胞，避免损伤细胞，确保细胞状态良好。

- ⑥. 按照下表，在无菌、DNase/RNase Free 的离心管 1 中按顺序依次加入以下试剂：5  $\mu\text{l}$  混合后的 Lonza P3 电转液、1.2  $\mu\text{l}$ （即 120 pmol）的 sgRNA、1.6  $\mu\text{l}$ （即 40 pmol）的 Cas9 蛋白，充分混匀后，在室温下孵育 10 分钟以形成 RNP 混合物。然后加入 2  $\mu\text{l}$ （即 4  $\mu\text{g}$ ）HDRT，并与 RNP 混合物轻轻混匀，室温孵育 2 分钟，形成 RNP&HDRT 混合物。

加样顺序	Tube 1 试剂	浓度	加样量 / 个样品
1	Lonza P3 电转液	-	5 $\mu\text{l}$
2	sgRNA	100 $\mu\text{M}$ (100 pmol/ $\mu\text{l}$ )	1.2 $\mu\text{l}$ (即 120pmol)
3	Cas9 蛋白	25 $\mu\text{M}$ (25 pmol/ $\mu\text{l}$ )	1.6 $\mu\text{l}$ (即 40 pmol)
室温孵育 10 分钟			
4	HDRT	2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (ssDNA)	2 $\mu\text{l}$
室温孵育 2 分钟			

**注意：**确保 RNP 混合时 Cas9 蛋白是最后一个添加的。针对基因敲除实验，不需要添加 HDRT。表中 Cas9 与 sgRNA 的比例为 1:3，对于 0.5-4.0 kb 左右长度的 ssDNA，HDRT 加入量建议为 4  $\mu\text{g}$ 。针对具体实验，建议进行优化预实验，以确定最佳 Cas9:sgRNA 比例、Cas9 蛋白和 HDRT 的加入量。建议优化预实验中，Cas9:sgRNA 的比例可以设置在 1:1 到 1:4 之间；建议 ssDNA 的加入量设置在 2  $\mu\text{g}$ -6  $\mu\text{g}$  之间（该数值基于 HDRT 的长度在 0.5 kb 到 4.0 kb 之间，如果超出范围，可能需要适当调整加入量）。第一次实验建议分别设置阴性对照（Cas9 蛋白与无靶标的 sgRNA 或无 sgRNA）、阳性对照（选择已验证的高效的基因敲入体系）和转染对照（GFP 表达质粒，确保转染的稳定性）。

- ⑦. 在 CRISPR 试剂孵育期间，计数并收集所需数量的细胞，每个电转反应需要  $1 \times 10^6$  个细胞。室温下，90g 离心 10 分钟，弃掉上清，收集细胞。  
**注意：**尽量在避免细胞丢失的前提下将上清去除干净。
- ⑧. 用配置好的 Lonza P3 电转缓冲液（每个反应 15  $\mu$ l）小心重悬细胞沉淀，最终密度为  $6.67 \times 10^7$  个细胞/ml，置于 Tube 2。  
**注意：**移液时，细胞悬液需频繁/轻柔吹打以防止细胞沉降，快速且小心地进行移液操作。避免将细胞悬液在室温下存放超过 20 分钟，以避免降低细胞活力和转染效率。
- ⑨. 小心地从 Tube 2 取 15  $\mu$ l 细胞悬液，加入装有 RNP&HDRT 混合物的 Tube 1 中，并轻轻混匀。
- ⑩. 将混合均匀的溶液转移至 16 孔的 Nucleocuvette™电转板条中。  
**注意：**移液过程避免气泡产生，气泡会在造成电转过程产生电火花。
- ⑪. 轻柔的敲击 Nucleocuvette™电转板条，确保样品溶液覆盖电转孔的底部。  
**注意：**如果溶液没有完全覆盖到电转孔的底部，电转过程中会出现报错。
- ⑫. 盖上 Nucleocuvette™电转板条的盖子，将电转板条放置于 4D-Nucleofector™ X Unit 的板条托槽内，并检查确保板条的方向正确。
- ⑬. 点击 4D-Nucleofector™ Core Unit 屏幕上“Start”，开始电转过程。
- ⑭. 运行完成后，立即从机器板条托槽上小心取出 Nucleocuvette™电转板条，向每个孔中加入 80  $\mu$ l 预热的培养基（不含细胞因子），无需混匀，让细胞在电转板条中，送入 37°C/5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置 0.5-1 小时。  
**注意：**孵育时间可以适当调整到 1-2 小时，可以在一定程度上提高细胞活力。
- ⑮. 孵育完成后，将细胞转移到准备好的预热的 48 孔板中，该培养板每孔含有 700  $\mu$ l 的含有 5% FBS 的 X-VIVO™ 15 培养基（含 200 U/ml 的 IL-2、5 ng/ml 的 IL-7-1、5 ng/ml 的 IL-15），置于 37°C/5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。  
**注意：**如果细胞转移后，依然有细胞残留，可另外加一些预热培养基到电转孔中，使用移液器轻轻吹打几次并转移，确保电转孔中没有残余的细胞。

#### 4. 电转后细胞培养与分析

- ①. 电转后，T 细胞应使用含有 5% FBS 的 X-VIVO™ 15 培养基（含 200 U/ml 的 IL-2、5 ng/ml 的 IL-7、5 ng/ml 的 IL-15），在 48 孔板中培养。
- ②. 电转后每 2-3 天，应额外补充含有 5% FBS 的新鲜培养基，以及新鲜 IL-2、IL7 和 IL15，维持最终浓度分别为 200 U/ml、5 ng/ml 和 5 ng/ml。

- ③. 如有必要，将细胞转移到更大的培养容器中，细胞密度维持在  $1 \times 10^6$  个细胞/ml。
- ④. 培养 3 天后，可进行基因敲除结果分析；为避免可能存在的背景信号的影响，敲入效率的分析建议检测时间延长至 5-7 天。

## 5. 故障排除指南

潜在问题	问题原因排查	推荐解决方案
细胞培养板上没有细胞	在细胞吹打或弃掉上清的过程中，细胞损失，未进入电穿孔程序。	弃掉细胞样品上清液时要小心，避免细胞损失。
	细胞遗留在 Nucleocuvette™ 电转板条内	电转完成后，加入预热培养基，反复吹匀几次，确保细胞不会沉降在电转孔底部。
不同样品之间，细胞分布差异显著	细胞悬液的分布不均匀	轻柔并充分的混匀细胞悬液，然后再加入到 RNP 和 HDRT 混合物试剂中，注意持续轻柔的晃动混合悬液从而避免细胞沉降。使用同一个批次处理的细胞，应用于同一次实验的不同组别。
	细胞遗留在 Nucleocuvette™ 电转板条内。	电转完成后，加入额外的预热培养基，轻轻吹匀几次后再次转移到 48 孔板，确保细胞不会沉降在电转孔底部。
	细胞+RNP&HDRT 预混液未完全转移至 16 孔 Nucleocuvette™ 电转板条内。	将预混液转移到 16 孔 Nucleocuvette™ 板条时，适当增加移液器体积以确保完成样品的全部转移。
	细胞培养皿中细胞分布不均。	轻轻拍打细胞培养板的侧壁，使细胞均匀分布。
细胞存活率低	待转入的 DNA 质量差	使用高质量、低内毒素 (<10 EU/mg) 和适当浓度 (2-6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 的 DNA。
	过量的 HDRT 造成内源性的免疫反应	设置一系列从高到低的 HDRT 浓度进行预实验测试，选择合适的剂量用于电转，兼顾细胞活力和编辑效率。
	不适当的激活时间	推荐激活时间为 2 天，可根据您的实验系统进行调整。过度刺激或不完全刺激可能会降低细胞活力。
	细胞状态差、受到损伤	在细胞培养与收集过程中避免高速离心等损伤性操作，轻柔的吹匀与转移细胞。避免将细胞置于 Lonza P3 电转缓冲液中超过 20 分钟。电转后，使用预热的不含抗生素和细胞因

		子的培养基孵育细胞。
	细胞培养条件不合适	在电转前或电转后，避免细胞密度过高或者过低从而影响细胞活力。
	细胞数量不够	确保 $1 \times 10^6$ 个细胞/个样品，细胞数 $< 8 \times 10^5$ 会显著降低核转染后的细胞活力。
	PBMCs 细胞活率低	避免使用已冻存 6 个月以上的 PBMC 细胞；如果可能，建议使用新鲜的 PBMC 细胞。
基因敲除或敲入效率低	操作流程问题	建议进行优化预实验，测试关键试剂的剂量范围或比例，以找到更合适的方案。
	不适当的刺激时间	推荐刺激时间为 2 天，可根据您的实验系统进行调整。过度刺激或不完全刺激可能会降低敲除/敲入效率。
	待转入的 DNA 降解	DNA 在 $-20^\circ\text{C}$ 下储存不到 1 年，使用前充分混匀并测定浓度。
	待转入的 sgRNA 降解	将 sgRNA 分成 5-10 $\mu\text{l}$ /管， $-20^\circ\text{C}$ 最多储存 6 个月， $-80^\circ\text{C}$ 最多储存 1 年。避免反复冻融超过 10 次。
	Cas9 蛋白降解或失活	使用在有效期内的 Cas9 蛋白，避免储存时间超过 6 个月。避免反复将 Cas9 从冰箱中取出。 将 Cas9 分为 20 $\mu\text{l}$ /管， $-20^\circ\text{C}$ 储存。储存体积必须大于 10 $\mu\text{l}$ ，避免 Cas9 活性降低。
	Lonza P3 电转缓冲液过期	Nucleofector™ 电转溶液和补充溶液混合后，3 个月内用完。
	细胞数量不正确	确保 $1 \times 10^6$ 细胞/个样品，细胞数 $> 1.2 \times 10^6$ 或 $< 8 \times 10^5$ 个细胞/个样品，会显著降低基因敲除或敲入效率。
	核转染过程中出现电火花	避免气泡进入 16 孔 Nucleocuvette™ 电转板条内。
	支原体污染细胞	检测细胞是否存在支原体污染。存在污染则需使用其他库存细胞开展新一轮的细胞培养。
	分析方法不当	检查检测和分析方法的合理性及操作的严谨性，必要时改变分析方法。

### 金斯瑞 CRISPR 相关服务

- **EasyEdit sgRNA:** 筛选阶段-细胞毒性低、编辑效率高、更稳定、更快更经济、即买即用
- **SafeEdit sgRNA:** 验证阶段-细胞毒性低、编辑效率高、更稳定、HPLC 纯化、定制化 QC
- **GenExact™ ssDNA:** 细胞毒性低、脱靶效应低、敲入效率高，提供科研至临床前研究级