



艾迪基因
EDITGENE

加速基因编辑进程,造福人类健康

www.edgene.cn



艾迪基因 piggyBac 转座子系统试剂盒

EDITGENE piggyBac Transposon System Reagent

产品说明书

中国总部: 020-3223-8856

美国办事处: 833-2263234

总部地址: 广东省广州市黄埔区科学城掬泉路3号广州国际企业孵化器D栋5F





目录

▶ 产品信息	3
▶ 产品概述	3
▶ 适用范围	3
▶ 产品组分	4
试剂盒组分	4
质粒图谱示图	4
▶ 储存条件及有效期	5
▶ 所需其他材料	5
▶ 操作流程图	5
▶ 实验操作	5
细胞预实验	5
正式实验	6
▶ 常见的问题及其解决方案	7
▶ 应用案例	8
▶ 注意事项	9
▶ 附录	10





piggyBac 转座子系统试剂盒

产品信息

货号	产品名称	组分
EDY004-Y01	piggyBac 转座子系统试剂盒	PB 系统质粒

产品概述

本试剂盒是 piggyBac 转座子系统试剂盒, 可提供细胞和 PB 系统质粒。PB 系统质粒包含有: 一个辅助质粒: 编码转座酶; 一个转座子质粒: 两端含转座子特异性反向重复序列 (ITR), 中间是被转座基因区域, 可转座到宿主基因组中。实验时需同时将辅助质粒和转座子质粒共同转染靶细胞, 辅助质粒编码的转座酶识别转座子质粒两端的 ITR 序列并切割, 释放的被转座基因区域由转座酶整合到宿主基因组中含 TTAA 序列的位点, 并在被转座区两端出现 TTAA 重复序列, 当再次转染辅助质粒时转座酶可将基因组中的转座子移除。

piggyBac 转座子系统作为非病毒载体, 与传统的病毒载体相比, PiggyBac 具有以下优势: 安全性高、操作方便 (可直接用质粒转化细胞); 载体容量大, 可实现多基因的共表达; 可通过调节转座子质粒和辅助质粒的比例, 提高外源基因的整合效率, 并且可通过反向 PCR 精确定目基因插入的位置; 再次转座后实现转座子精确切离; 宿主范围广, 转座效率高, 较少依赖宿主因子。

适用范围

本试剂盒为非病毒基因递送, 适用并不局限于基因治疗、体细胞重编程、细胞和动物模型构建和基因编辑细胞株构建等。



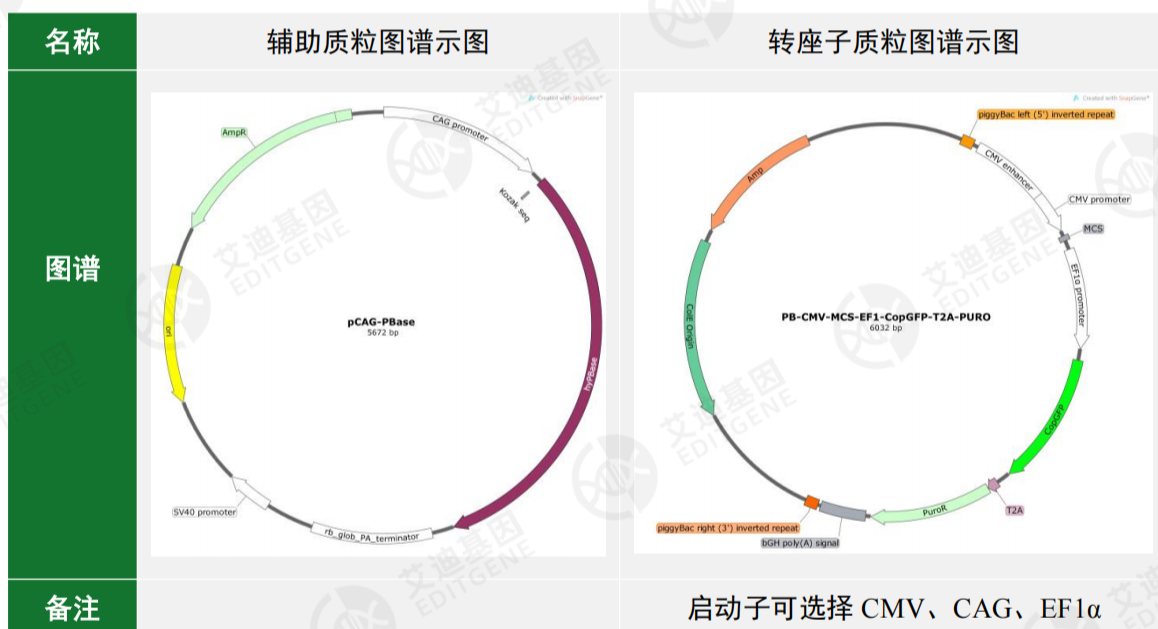


▶ 产品组分

● 试剂盒组分

组分		规格	储存温度
PB 系统质粒	辅助质粒 (500 ng/ μ L)	pCAG-PBase	4 μ g
	转座子质粒 (500 ng/ μ L)	PB-CMV-MCS-EF1 α - CopGFP-T2A-Puro	10 μ g

● 质粒图谱示图



注意:

- (1) 为便于转染后富集成功转座细胞, PB Plasmids 具有 Puromycin 抗性; 此外 PB-CopGFP 具有 Puromycin 抗性, 可用于预转染和筛选。
- (2) 本试剂盒可进行 5 次 6 孔板转染; 辅助质粒与转座子质粒转染质量比例可在 1:2.5 - 1:5 进行调整, 推荐使用比例为 1:3。
- (3) 本试剂盒优先推荐与艾迪基因提供细胞搭配使用。





► 储存条件及有效期

保存条件: -20 °C, 有效期 1 年。

► 所需其他材料

完成本实验可能需要本试剂盒未提供的其他材料:

试剂	细胞培养基、血清、PBS、胰酶、嘌呤霉素 (Puromycin)、Opti-MEM I 细胞冻存液、转染试剂等
耗材	6 孔板、各种规格 tips、离心管等 (均要求无菌)
设备	生物安全柜/无菌操作台、细胞培养箱、荧光显微镜、离心机、PCR 仪、琼脂糖凝胶电泳仪、凝胶成像仪、移液枪等

► 操作流程图



图 1 PB 基因转座细胞株构建流程示意图

► 实验操作

● 细胞预实验

1. 转染预实验

试剂盒中的转座子质粒带有绿色荧光 CopGFP, 可搭配辅助质粒使用, 也可单独进行瞬转, 适用于转染条件摸索, 便于正式实验的顺利开展。

注意: 高效的转染效率是成功编辑的前提。例如 293T、Hela、A549、N2A 等常用细胞采用脂质体转染有效; 对于一些治疗相关细胞转染比较困难, 最佳转染方式和参数差异大, 建





议优化转染方法后再进行实验。

2. Puromycin 药筛浓度摸索

- (1) 将对数生长期的细胞接种至 12 孔板中, 培养基总体积为 1 mL/孔, 置于培养箱中培养 24 小时。
- (2) 当汇合度达到 60%-70%时, 将 12 孔板中的培养基换成含有不同浓度抗生素的药筛培养基, 比如 Puromycin, 浓度梯度为: 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5 $\mu\text{g/mL}$ 。
- (3) 每隔 2 天更换含 Puromycin 的完全培养基, 7 天后镜下观察细胞, 选择 Puromycin 完全杀死细胞的最低浓度作为后续实验的药物筛选浓度 (最佳药筛浓度)。

● 正式实验

1. 细胞转染

以 Lipofectamine 3000 (以下简称 Lipo 3000) 转染为例, 若使用电穿孔方法转染建议按电转仪实际推荐参数进行转染条件优化。

- (1) 将对数生长期的细胞消化计数。
- (2) 取适量细胞接种于 6 孔板中, 放入培养箱中培养。

注意: 不同细胞由于生长速率差异, 建议控制细胞量培养 18-24 小时后融合率约为 80%。

- (3) 培养 18-24 小时后进行转染, 此时细胞的融合率应约为 80%。
- (4) 根据下表配制质粒混合液;

组分	6 孔板使用量
辅助质粒	0.6 μg
转座子质粒	1.9 μg
Add opti-MEM I to	125 μL

- (5) 加 2 μL P3000 reagent, 轻轻吹打混匀;
- (6) 配制 Lipo 3000-opti-MEM I, 轻轻吹打混匀;

组分	6 孔板使用量
Lipo 3000	7.5 μL
Add opti-MEM I to	125 μL

- (7) 加 125 μL 质粒混合液到 125 μL Lipo 3000-opti-MEM I, 轻轻吹打混匀, 室温静置孵育 15 min, 小心滴加在培养基中, 轻轻摇匀, 放入培养箱中培养。





(8) 转染第二天上午将细胞传至 T25, 放入培养箱中继续培养。

注意: Lipofectamine 3000 转染具有细胞毒性, 建议转染后 4-24 h 换液。

2. 抗性筛选

转染 48 小时后, 镜下观察细胞活率和荧光率, 更换成含 Puromycin 的完全培养基进行筛选。抗生素浓度按照预实验浓缩的最佳药筛浓度, 药筛时间为 2 周, 筛选完成后更换含半药 Puromycin 的完全培养基扩大培养。

3. 基因转座细胞株检测

筛选后成功转座的细胞可通过 qPCR 或 WB 方法进行基因表达量的检测。

4. 细胞扩增与冻存

将鉴定合格的细胞进行半药维持扩增和冻存, 或者继续进行下游实验。

► 常见的问题及其解决方案

1. piggyBac 转座子系统试剂盒推荐脂质体转染还是电转染?

A: 试剂盒中 PB 系统均为质粒形式, 可同时适用于脂质体转染、电转染或其他转染方式。可以根据不同的细胞类型选择合适的转染方法和参数, 一般贴壁细胞多种转染方式均有效, 治疗相关细胞建议采用电转染。

2. 目的细胞转染效率低怎么办?

A: 建议正式试验前先进行转染预实验, 可尝试不同的转染方法, 摸索最佳转染条件, 如常用的化学转染方法 (如脂质体) 和物理转染法 (如电转)。好的转染效率是基因成功转座的前提。

3. 如何判断 piggyBac 转座子系统试剂盒有转座活性?

A: 试剂盒提供的转座子质粒含有 CopGFP 基因, 成功转座细胞可在荧光显微镜下观测到绿色荧光。由于细胞具有高度的异质性, 同一试剂盒在不同细胞中的转染效率和转座效率可能存在差异, 为避免由于转染原因对基因转座的影响, 建议对目的细胞先优化转染方法。

4. 使用 piggyBac 转座子系统试剂盒构建的细胞能否稳定传代?

A: 能。piggyBac 转座子系统试剂盒靶向细胞基因组 DNA 进行转座, 获得目的细胞的基因型能够稳定遗传至子代细胞。注意: 获得转座细胞后需要继续半药维持培养。





► 应用案例

1. 项目信息

细胞名称	MC38
基因	Cas9

2. 转座结果检测

MC38 细胞 Puromycin 筛选 2 周, 获得 MC38-PB-Cas9 转座细胞, 经过靶向 ITGA5 的 sgRNA 活性验证, ITGA5 基因敲除效率高达 95%, 证明 MC38 细胞 Cas9 基因转座后表达高活性 Cas9 蛋白。

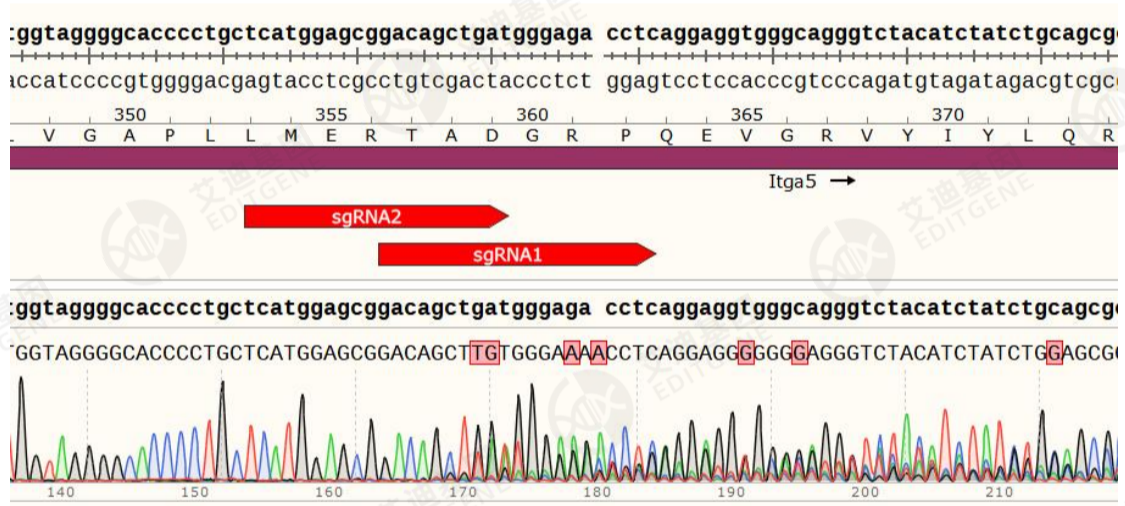


图 2 MC38-PB-Cas9 细胞 ITGA5 基因敲除 Sanger 测序结果



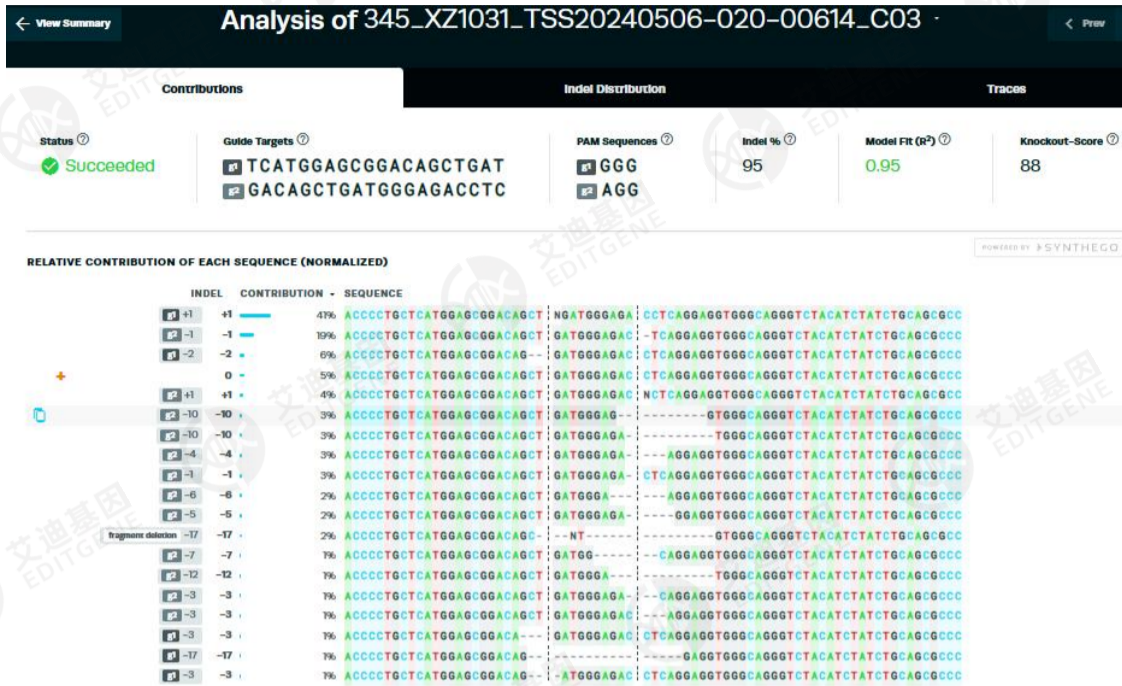


图 3 MC38-PB-Cas9 细胞转染 ITGA5 基因敲除 ICE 分析敲除效率

► 注意事项

- (1) 本产品仅供实验室作为科研目的使用，请严格遵守相关法律法规和伦理要求，否则产生一切后果与本公司无关。
- (2) 请按要求运输、存储及使用试剂，非必要请勿反复冻融，因未按要求保存、操作造成的实验失败，本公司概不负责。





附录

艾迪基因可提供以下转座子质粒：

质粒名称	描述
piggybac-pCMV-MCS-EF1-CopGFP-PURO	双启动子转座子载体， 含 CopGFP, Puromycin 抗性
piggybac-pEF1a-MCS-EF1-CopGFP-PURO	双启动子转座子载体， 含 CopGFP, Puromycin 抗性
piggybac-pCAG-MCS-EF1-CopGFP-PURO	双启动子转座子载体， 含 copGFP, puromycin 抗性
piggybac-pCMV-MCS-EF1-PURO	双启动子转座子载体，含 puromycin 抗性
piggybac-pEF1a-MCS-EF1-PURO	双启动子转座子载体，含 puromycin 抗性
piggybac-pCAG-MCS-EF1-PURO	双启动子转座子载体，含 puromycin 抗性

