

圣尔生物基因敲除检测 试剂盒说明书

(Special for ZFN, TALEN and CRISPR/Cas9)

Cat. No. SB-QC0102, SB-QC0103

目录

圣尔生物基因敲除检测 试剂盒说明书	1
(Special for ZFN, TALEN and CRISPR/Cas9)	1
图	1
I. 组份列表	2
II. 附加产品推荐	2
III. 产品概要	3
IV. 操作步骤	4
1) 基因组 DNA 的准备	4
2) 杂交 DNA 的准备	4
A. PCR 引物设计	4
B. PCR 扩增, 获得突变型 DNA 产物	5
C. 获得杂交 DNA	5
3) 大圣Enzyme 酶切筛选阳性克隆	5
A. 杂交后直接酶切验证	5
B. 复检筛选两个亲本相同 KO 情况的阳性单克隆	6
V. 结果分析	7
A. 混合样本分析:	7
B. 单克隆结果分析	7
VII. 附录	12

图

Figure 1. 操作流程

Figure 2. 阳性对照和 Pool 检测的电泳结果

Figure 3. K562 细胞中 Atg10 基因敲除案例

Figure 4. 扩增获得目的片段一轮 PCR (上)和二轮 PCR (下)电泳图

Figure 5. PCR 扩增目的片段有杂带, 但不影响酶切的酶切电泳图

I. 组份列表

圣尔生物基因敲除检测试剂盒分 25 rxns、100 rxns 和"Custom"共 3 种规格。

Table1. 圣尔生物基因敲除检测试剂盒组份列表

产品组份	25 rxns (Cat.No.:SB-QC0102)	100 rxns (Cat.No.:SB-QC0103)
试剂 A	6 ml × 1	10 ml × 2
试剂 B	300 μl × 1	1 ml × 1
大圣Enzyme	25 μl	100 μl
5× Buffer	100 μl	300 μl
G- Taq DNA polymerase	8 μl	30 μl
10×G- Taq Buffer	80 μl	300 μl
6×Stop Buffer	100 μl	300 μl
Positive Control DNA(100 ng/ μl)	30 μl	100 μl

贮存条件:

将 大圣Enzyme、G- Taq DNA polymerase、Positive Control DNA 置于-20℃保存，且避免污染； 将 试剂 A、试剂 B、 5× Buffer、10×G- Taq Buffer、6×Stop Buffer 置于 2~8℃。

保质期:

以上条件下，保质期：6 个月。

※注意：产品组份大圣Enzyme 在-20℃时为固态，使用时建议低温解冻(4℃)。并建议将该组份分装保存且避免反复冻融，或反复冻融次数不超过 5 次。

II. 附加产品推荐

本试剂盒不包含以下所需试剂，您可以购买指定产品或购买替代产品进行实验。

- 细胞电转仪
- 单细胞培养板

III. 产品概要

圣尔生物基因敲除检测试剂盒是一款简便高效的基因敲除和基因多态性检测试剂盒，该试剂盒的核心成分是大圣酶，它是一种具天然强活性的核酸内切酶，与 *Cel I* 同源。该酶能够高效特异地识别异源双链 DNA 的突变位点，并从突变位点的 3'-端高效地切割异源双链 DNA。圣尔生物基因敲除检测试剂盒广泛应用于精确检测人、哺乳动物、细菌、真菌、病毒以及植物基因的敲除，尤其适用于 CRISPR/Cas9 技术、TALENs 技术和 ZFNs 技术的基因敲除研究。

产品性能

1. 检测速度快：只需 5~20 min，便可检测到各种类型的碱基突变，如：碱基替换、插入和缺失等；
2. 操作方便：无需胶回收纯化，PCR 产物直接进行酶切验证；
3. 特异性高：识别范围最小为 1 bp 的突变位点，最大可达上百 bp 的突变序列；
4. 检测方便：酶切后的 PCR 产物，可以通过常规琼脂糖凝胶电泳快速检测；
5. 混合样本分析：酶切分析混合样品(cell pool)的 PCR 产物，根据电泳结果计算突变率。

应用方向

- a) 用于 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 实验中混合样品的敲除效率的检测；
- b) 用于 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 实验中阳性克隆的筛选。

以下是 圣尔生物基因敲除检测试剂盒的操作流程图：

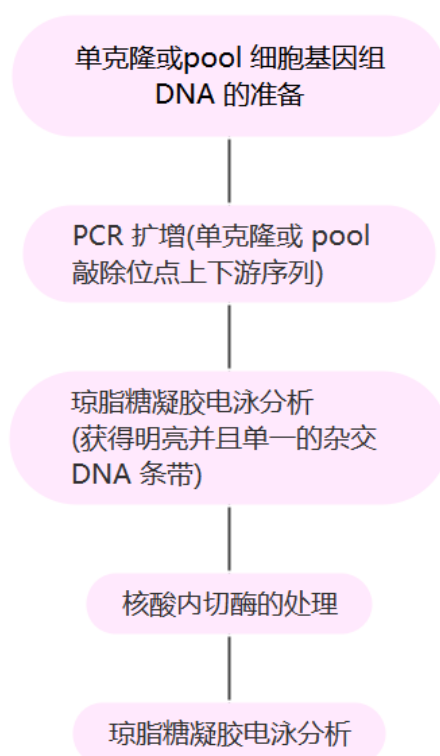


Figure1. 操作流程圖

IV. 操作步骤

1) 基因组 DNA 的准备

使用试剂 A 和试剂 B 提取细胞的基因组 DNA，少至 50~500 个左右的细胞即可提取出全基因组 DNA。

1. 一般取 $100 \sim 10^4$ 个细胞于 1.5 ml EP 管中^①，室温 1500 rpm 离心 5 min，小心吸掉培养液；

※注意：对于细胞不可见的情况，允许留下少量液体；吸取上清时，分两次进行，第一次枪头放于距离离心管底部约 5 mm 处，吸去大部分上清，第二次用枪头缓慢的将残留的液体吸除。

2. 用 150 μ l PBS 重悬细胞，4℃，1500 rpm，离心 5 min，小心吸掉上清（注意点同上）；

3. 若细胞量较大，建议重复一次步骤 2，细胞量少步骤 2 也可不做；

4. 向离心管中加入适量体积（推荐体积为 50~200 μ l，如因细胞量比较少保留了少量的液体，应适当增加用量）预先配制的溶液 A 与溶液 B 的混合液^②，枪头吹打 5 次，使细胞充分裂解，于冰上放置 10 min；

5. 加入两倍体积的无水乙醇，颠倒混匀（保证离心管内没有透明的折光物质存在，混匀的情况下，内部液体均一，细胞量多的情况下会马上能看到絮状沉淀，细胞量少看不见，但不影响最终收获），-20℃ 条件下沉淀 20 min 以上（可适当延长至几小时，细胞量少请沉淀过夜）；

6. 取出后，4℃，12000 rpm，离心 30 min，直接倾倒入管内上清，并在吸水纸上轻轻倒扣几次；

※注意：离心机须提前预冷，离心管放入时有方向性，所有离心管一致，以便清楚的知道基因组沉淀在哪，避免对于量少的情况到最后一步会不小心吸走沉淀。

7. 加入 400~500 μ l 预冷（-20℃）的 75% 乙醇洗涤沉淀，4℃，12000 rpm，离心 10 min，直接倾倒入管内上清，并在吸水纸上轻轻倒扣几次，建议重复一次步骤 7；

8. 4℃，12000 rpm，离心 10 sec，用 20 μ l 枪头小心吸掉离心管底部残留的液体；

※注意：此步骤非常关键，注意避开底部的沉淀，乙醇一定要吸干净，管底和管壁不能残留一点液体。

9. 置于超净台或通风橱等空气流动处晾干（时间不要超过 5 min）；

10. 加入适量体积（推荐体积为 10~30 μ l）灭菌的重蒸水溶解沉淀（可用移液枪吹打管壁，提高 DNA 得率^③），测量浓度，直接用于 PCR 或者 -20℃ 保存。

※注意：①细胞数目大于 1×10^4 时，建议在步骤 5 前加入等体积的酚：氯仿：异戊醇（25：24：1），震荡混匀后，4℃，12000 rpm，离心 20 min，取上层液体，移入新的离心管；

②混合液中试剂 A 与试剂 B 的体积比例为 20:1，为确保使用效果，混合液请现配现用，4℃可保存 15 天；

③本产品只含有提取基因组 DNA 的两个主要成分试剂 A 和试剂 B，以上步骤中提及的其他辅助试剂请自行准备。

2) 杂交 DNA 的准备

A. PCR 引物设计

需在位点上下游各设计一条高特异性引物，用于后续 PCR 或测序检测阳性克隆，引物能扩增约 200-500bp 的 DNA 片段，上下游引物距突变位点约 100-400bp。以尽可能增强酶切结果的可观察性。例如：使用 PCR 扩增获得全长为 400 bp 的 DNA 片段，通过调整引物位置，使得预计的突变位点位于距 5'-端 140 bp 处，则核酸酶酶切后获得片段应为 140 bp、260 bp，电泳检测时就能清晰分辨出这三条片段。

将设计后的序列送到值得信赖的公司合成，纯化级别为 PAGE。扩增出来的目的片段要求明亮单一，如遇到条带弱，有杂带等其它问题，请参考本说明书第 9 页 FAQ 的 Q-1 进行纠正。

B. PCR 扩增，获得突变型 DNA 产物

在灭菌 PCR 管中配制如下反应体系，使用高特异性的 Primers，扩增获得实验组 DNA 产物。若需扩增的片段中 GC 含量较高，则推荐使用高G-C PCR Buffer 在以下体系中添加终浓度为 6%的 DMSO，可使扩增出来的条带更亮些。

实验组 DNA	100 ng
10×G- Taq Buffer	3 µl
DMSO	1.8 µl
dNTP (10mM each)	0.6 µl
Primer-F	1.2 µl
Primer-R	1.2 µl
G- Taq DNA polymerase	0.3 µl
Add ddH ₂ O	to 30 µl

PCR 反应程序推荐如下：

95℃ (预变性)	1 min	} 35~40 cycles
95℃ (变性)	10 s	
55~62* (退火)	10 s	
72℃ (延伸)	20 s	
72℃ (彻底延伸)	5 min	

※注意：引物的退火温度由溶解温度(melting temperature, T_m)值决定，推荐比 T_m 值低 1~2℃。

PCR 结束后，取 2~3µl 进行电泳检测，要求目的片段明亮并且单一，以便于后续酶切结果分析（此步骤不能省略，若条带不亮或有杂带，请参照本说明书第9页 FAQ 的 Q-1）。

C. 获得杂交 DNA

1) PCR 结束后，将 PCR 产物(实验组目的片段)反应管置于 PCR 仪中 98℃ 孵育 3min；

2) 孵育后，不要打开 PCR 仪的盖子，将 PCR 反应管留在 PCR 仪中放置 20min 以上，自然冷却（待管中液体温度下降至 40℃ 以下），获得充分杂交的 DNA。

※注意：本实验方法适用于绝大部分检测实验，即 PCR 产物中含有一种以上的目的片段。

3) 大圣Enzyme 酶切筛选阳性克隆

A. 杂交后直接酶切验证

1) 灭菌 PCR 管中配制如下反应体系(冰上操作，建议整个操作时间不超过 10min)：

PCR Products	3µl-4µl
大圣Enzyme	1µl

5× Buffer	2μl
Add ddH ₂ O to	10μl

2) 反应管置于 PCR 仪中，45℃孵育 20min 后，立刻降至 4℃；

3) PCR 仪温度降至 4℃后，应立刻向上述 10 μl 反应体系内加入 2μl 6×Stop Buffer，随后进行琼脂糖凝胶电泳检测或置于-20℃保存。

※注意：a. 另设阳性对照管(100 ng/μl 阳性对照取 2 μl)，阴性对照管(未突变基因组 PCR 产物)；

b. 酶切后产物进行凝胶电泳检测时，建议使用较高浓度的、新鲜配制的琼脂糖凝胶，有利于结果的观察。推荐使用浓度为 2 %~2.5%的琼脂糖凝胶电泳，若酶切片段的大小相近且需要将其分开显示，可适当延长电泳时间；

c. 推荐使用溴化乙锭(ethidium bromide, EB)染色法，提高灵敏度，用此染色法无需再向酶切反应管中加入loading buffer(因为Stop buffer 中含有 loading buffer 成分)；若使用其他染色方法，则无需向酶切反应管中加入Stop buffer，而改为参照其他染色法的说明书进行实验；

d. 切记若不能即刻进行电泳操作，需在 PCR 温度降至 4℃后立即加入 loading buffer 置于-20℃以下保存，切勿室温或者 4 度保存。

B. 复检筛选两个亲本相同 KO 情况的阳性单克隆

如果检测的样本为单克隆，则将 A 步骤电泳结果中得到的阴性单克隆间进行两两杂交反应，再进行酶切，此做法可以筛选出两个亲本相同敲除情况的克隆，步骤如下：

1) 灭菌 PCR 管中配制如下反应体系(冰上操作，建议整个操作时间不超过 10min)：

A 步骤单克隆筛选结果中阴性克隆的 PCR 产物两两之间按照等体积比 1:1 共 2-5μl

5× Buffer	2μl
Add ddH ₂ O to	9μl

2) 将 PCR 反应管置于 PCR 仪中 98℃孵育 3min；

3) 孵育后，不要打开 PCR 仪的盖子，将 PCR 反应管留在 PCR 仪中放置 20min 以上，自然冷却(待管中液体温度下降至 40℃以下)，获得充分杂交的 DNA；

4) 向上述 PCR 反应管中直接加入 1μl 大圣Enzyme，45℃孵育 20min 后，立刻降至 4℃；

5) PCR 仪温度降至 4℃后，应立刻向上述 10 μl 反应体系内加入 2μl 6×Stop Buffer，随后进行琼脂糖凝胶电泳检测或置于-20℃保存。

※注意：同 A 步骤。

V. 结果分析

Positive Control DNA 为杂交后的 DNA 片段，经 核酸酶切割后形成三个明显片段，分别为 393 bp、134 bp、259 bp，其中 134 bp 和 259 bp 片段是酶切后片段，而 393 bp 片段为杂交形成的 homo-duplex DNA 片段，无酶切割位点，因此，片段大小不变（见 Figure2.）。

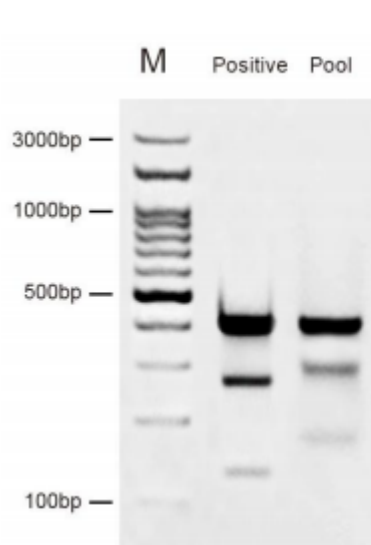


Figure 2. 阳性对照和 Pool 检测的电泳结果

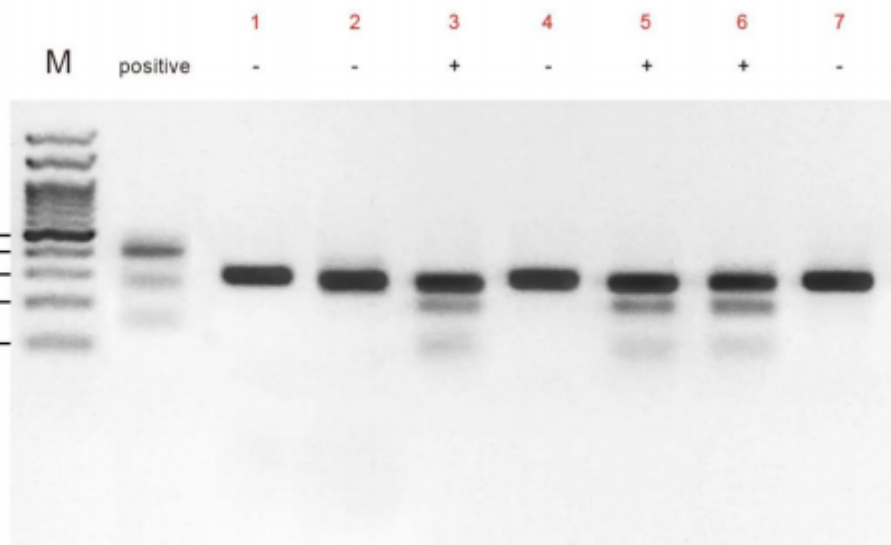


Figure 3. K562 细胞中Atg10 基因敲除案例

上图中，M：100 bp-DNA Marker； Positive：Positive Control DNA； Pool：混合克隆； Clone1-7：单克隆。

A. 混合样本分析：

根据酶切后条带的亮度大致估测敲除效率，并送测序验证。因不同宿主物种中敲除载体的转染效率的差异，Pool 验证阳性的可能性也会有较大差异，甚至存在 Pool 验证显示阴性，但最终却筛选到阳性克隆的情况，一般地，被转染的细胞比例越高，Pool 检测越容易进行（见 Figure2.）。

B. 单克隆结果分析

如上图 Figure3.所示为杂交后直接酶切的结果：clone3,5 和 6 为潜在的阳性克隆，后续直接进行 TA 克隆和测序验证等位基因突变情况。

进一步对上述阴性单克隆间进行两两杂交反应(例如 clone1 与 2 杂交，clone4 与 7 杂交.....)，再进行酶切，步骤如前述，然后再次电泳检测，结果分析如下：

①若电泳结果显示阴性，则可判定 Clone A 与 Clone B 均为野生型，即未敲除(当然不排除 Clone A 与 Clone B 均为纯合突变型且突变后序列完全一致，但几率较小，几乎为零，所以不考虑)。

②若电泳结果显示阳性(经验证明，这种情况几率也不是很大，此步骤能帮助筛选出两个亲本完全相同的敲除)，则说明 Clone A 与 Clone B 中至少有一个为两个亲本相同 KO 情况的纯合突变型，此时可将 Clone A、Clone B 分别与野生型杂交，再进行一轮酶切验证即可，阳性克隆送测序验证突变情况。

VI. FAQ

Q-1 : PCR 反应后, 电泳检测条带不亮, 或者有杂带怎么办?

A-1 : 建议在正式实验前先摸索好引物的 PCR 条件。

①若条带不亮, 则更换引物, 若是因为基因本身的序列问题 (如 GC 含量高), 无法找到合适的引物, 则取第一轮 PCR 产物 1 μ l, 以 30 μ l 体系扩增第二轮 (见下图 Figure 4.), 再用二轮产物进行后续的酶切实验。或者适当增加 PCR 循环数, 比如 40 cycles。

②若有杂带, 则更换引物, 若是因为基因本身的序列问题 (如特异性较低), 无法找到合适的引物, 此时若杂带的大小与酶切后产生的片段大小不同, 则可以直接酶切 (见下图 Figure 5 中红箭头处的条带大小则为杂带, 而它与下端的酶切条带大小不一致, 不影响判断)。

③若没有条带, 则需要确认细胞是否为该物种名称的细胞, 若用其它该物种的引物可以 PCR 出正确大小的条带, 则可以排除细胞错误的可能, 需重新设计 PCR 用引物, 或者尝试使用其它公司的高保真酶。

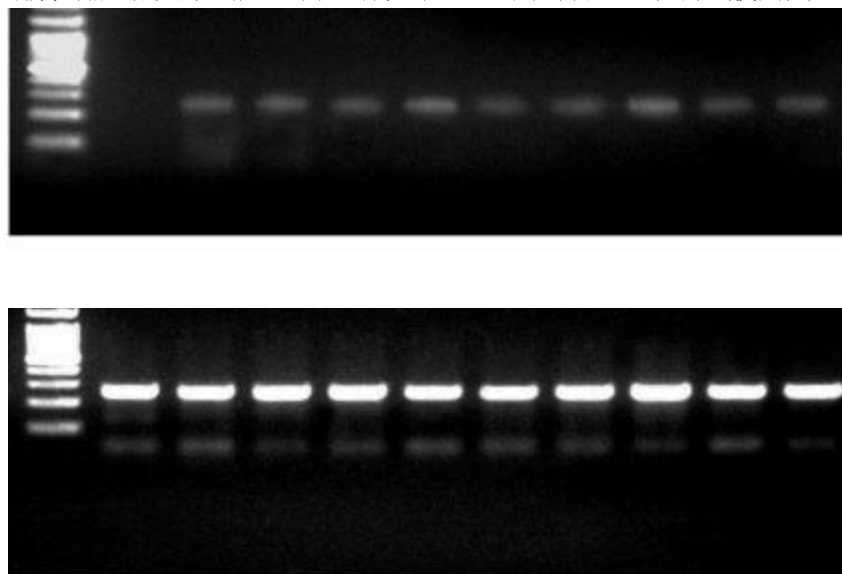


Figure 4. 扩增获得目的片段一轮 PCR (上)和二轮 PCR (下)电泳图

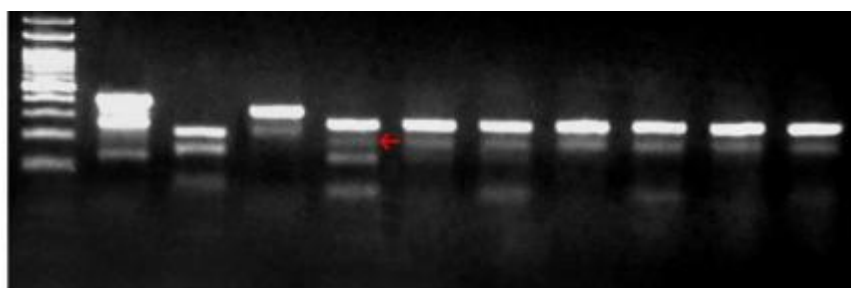


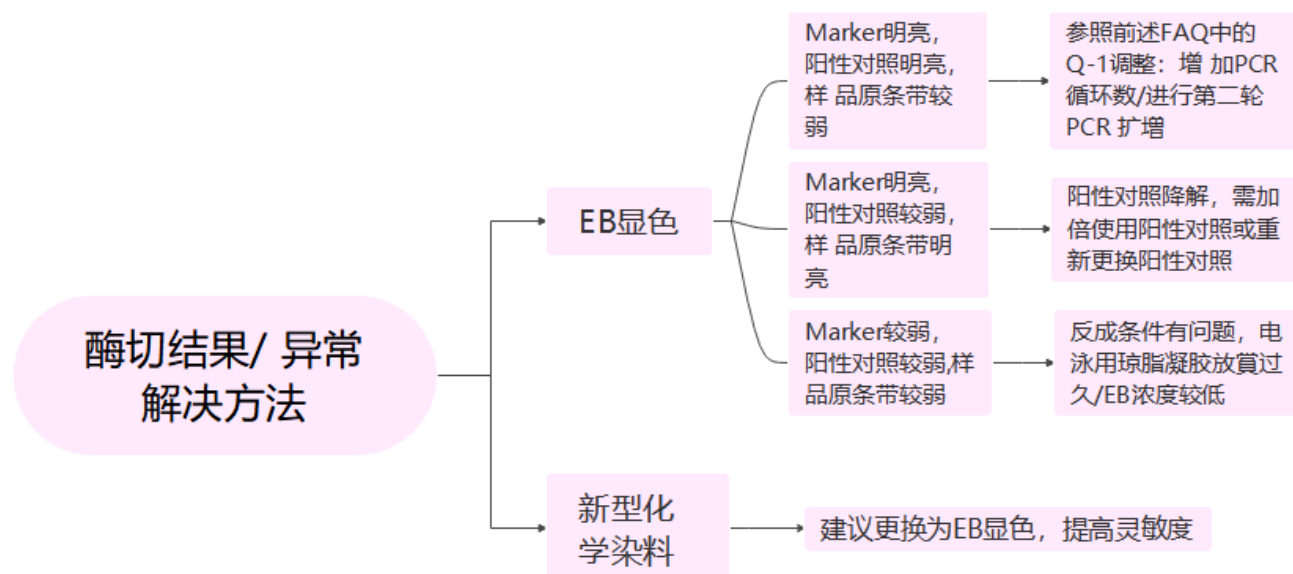
Figure 5. PCR 扩增目的片段有杂带, 但不影响酶切的酶切电泳图

Q-2 : 酶切后, 电泳结果仅有原片段而无酶切条带?

A-2 : 请先确定 Marker 是否明亮, 阳性对照是否正常 (阳性对照正常电泳图详见结果分析), 未酶切前原

PCR 片段是否明亮？

若是因为以上原因造成酶切结果异常(无酶切条带、酶切条带较弱)，请先按下图予以纠正。



在 Marker 明亮，阳性对照明亮且已被切开，样品原条带明亮的情况下，样品没有酶切条带，则造成该实验结果有以下几种可能：

- 样品均为阴性，即 DNA 片段中无突变位点，可重新进行上游实验，也可通过对该 DNA 片段进行测序验证；
- PCR 产物没有进行杂交，请检查反应底物是否经过杂交 DNA 步骤。
- 未使用本试剂盒中 PCR 用酶，导致与 酶反应体系冲突，请使用本试剂盒中 PCR 反应体系，并严格按照本说明书方法进行试验。
- DNA 片段中杂交 DNA 含量过低，致使反应后条带不易观察到。此情况应优先考虑改善杂交条件，杂交时以更缓慢的变速降温至 40℃ 以下，有条件的可使用金属浴或水浴退火。

Q-3：酶切后，电泳结果中原片段明亮但酶切条带较弱？

A-3：在 Marker 明亮，阳性对照明亮且已被切开，样品原条带明亮的情况下（若异常请先参照 Q-2 中的图予以纠正），样品酶切条带较弱，则可能是因为样品 DNA 片段中杂交 DNA 含量过低。该情况也常见于 cell pool 检测中，因 cell pool 中阳性克隆（靶基因突变细胞）比例过低，导致获得 DNA 片段中杂交 DNA 含量过少。此时建议加大底物量（10 μl 的酶切体系所加的底物量最多不超过 7 μl，所用酶 1 μl 量不变）对于单克隆筛选中出现此中情况，应优先考虑改善杂交条件，杂交时以更缓慢的变速降温至 40℃ 以下，有条件的可使用金属浴或水浴退火。

Q-4：酶切后，电泳结果酶切条带轻微弥散？

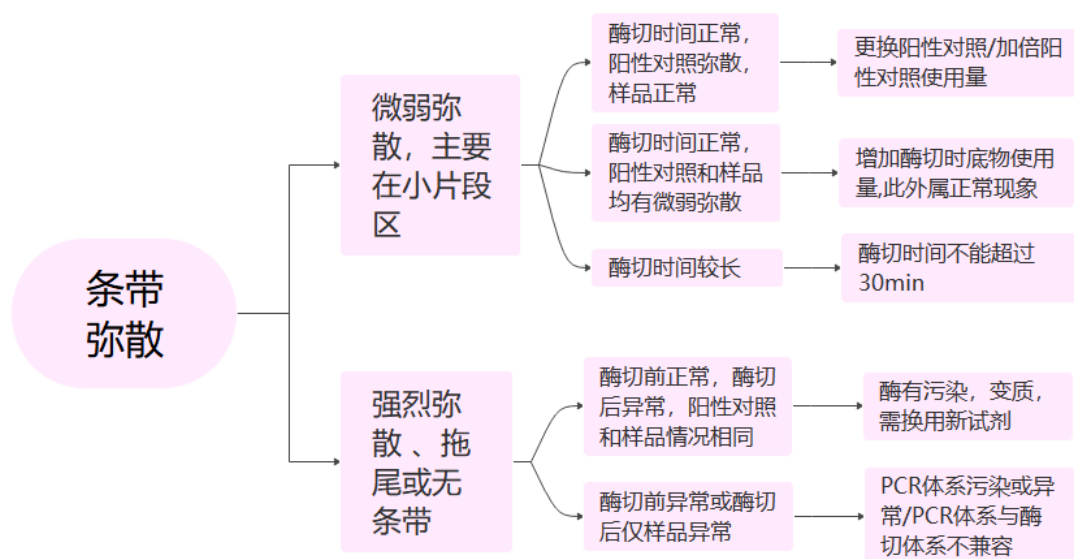
A-4：该现象可能原因如下：

当酶切后条带 < 200 bp，且经较长时间的核酸电泳，条带宽度变大，亮度不足时呈现类似弥散的带型；当突变位点过长，尤其当突变长度达到 50 bp 以上时，酶切后条带易出现弥散现象，此时弥散程度会因酶切后条带大小的不同而不同，片段越小弥散情况越明显。

原因可能如下：

- 酶切后条带较小，在电泳时导致条带宽度变大造成弥散，使用更高浓度的琼脂糖凝胶，如 2% 等；
- 琼脂糖凝胶放置过久，推荐使用新配置的胶；
- 样品有核酸酶污染；
- 反应体系中 Mg^{2+} 的含量不足时，此时可以每 10 μl 加入 3 μl 5× Buffer；

5、酶切反应结束要先等 PCR 仪温度降到 4℃后立即拿出加2 μl 6×Stop Buffer，随后立刻进行琼脂糖凝胶电泳检测或置于-20℃保存。



Q-5：酶切后，电泳结果中酶切条带大小不是预期大小？

A-5：出现该情况表明制备的 DNA 片段中含有其他杂交位点，可能性如下：

①制备的 DNA 片段存在其他 DNA 的污染，或者 KO 后缺失或者插入比较多长度，对于缺失或者插入比较多的情况，单纯的 PCR 结束电泳检测即可肉眼分别出阳性，cruiser 酶切可再次验证阳性；

②根据酶切结果：若酶切后形成的各条带单一，则在 DNA 片段上可能含有其他杂交位点，需通过进一步 DNA 测序检测；若形成的酶切条带数量远多于预期，且随机分布含一定弥散，则可能是 DNA 片段扩增中，DNA 聚合酶错配扩增导致，更换高保真 DNA 聚合酶重新进行扩增可消除影响；

③如果 PCR 反应出现非特异性扩增的条带，也会导致同样情况，解决方案见 FAQ 中的 Q-1 中有杂带的情况。

Q-6：酶切后，如何使电泳图酶切条带更亮？

A-6：为了改善酶切效果，使酶切出的条带更亮一点，通常采取以下措施：

- ①优先考虑改善杂交条件：杂交时以更缓慢的变速降温至 40℃以下，有条件的可使用金属或水浴退火；
- ②适当增加酶切底物量，如 2 μl 增加至 5 μl，最多不超过 7 μl（以 10 μl 酶切体系不变）
- ④增加样品 DNA 浓度：PCR 反应再扩增一轮。

Q-7：大圣Enzyme 检测结果是否会出现假阳性？

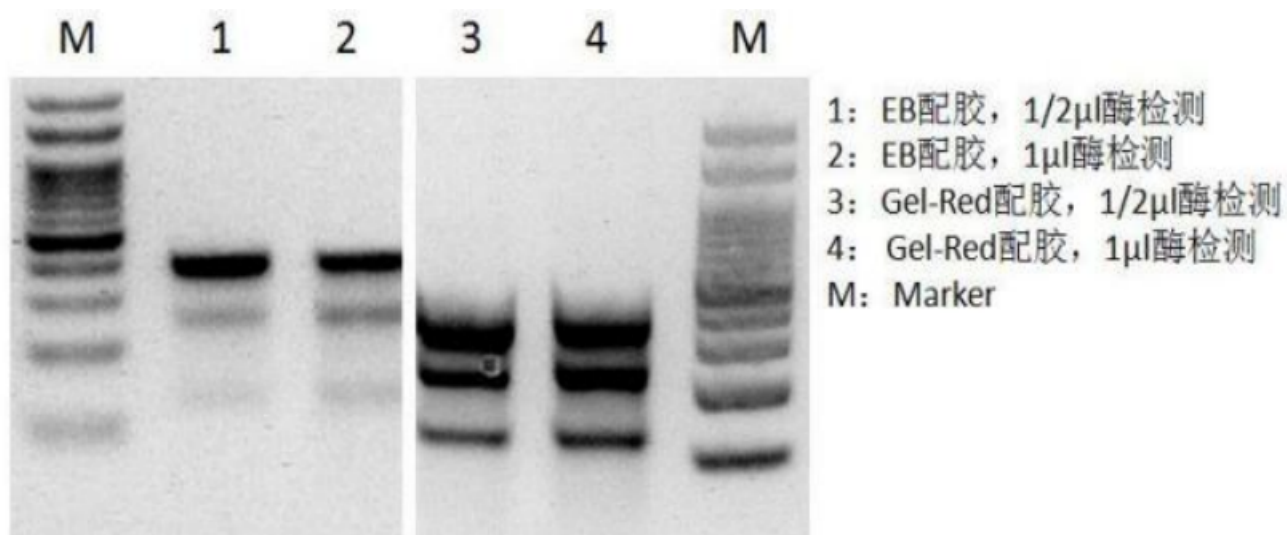
A-7：大圣Enzyme 是通过基因工程生产的 *CelI* 同源核酸内切酶，具有更好的稳定性、高度的特异性和高效性，它能够切割所有形式的碱基突变形成的异源 DNA 双链。目前为止，尚未有文献报道使用 大圣 Enzyme 或 *CelI* 会出现假阳性。

Q-8：酶切后，电泳结果中酶切条带大小与预期一致，就一定是纯合子吗？

A-8：因为杂交的 DNA 片段是通过 PCR 得到的，所以特异性没有任何问题。在得到与预期一致的酶切条带后，不能 100%判断该样本为纯合子，因为杂合子也能得出同样的结果。因此，需要对 PCR 片段进行的 TA 克隆和测序分析。

Q-9 : 大圣Enzyme 与新型化学染料的兼容性?

A-9 : 大圣Enzyme 在使用过程中, 针对很多实验室反映, 不让使用 EB 染料问题, 我们找了市面上常用的染料进行兼容性测试, 如市面上常用染料: GelRed。经过测试, 其与我们的 大圣Enzyme 是兼容 的, 而且染色效果不逊于 EB, 见下图:



VII. 附录

阳性对照说明:

等量野生型和突变型 DNA 片段混合，经 98℃加热、自然冷却后形成的杂交 DNA，该 DNA 链存在两处突变，均为单碱基突变，突变点间距 2 bp，如下图所示。经 核酸酶切割后形成三个明显片段，分别为 393 bp、134 bp、259 bp，其中 134 bp、259 bp 为酶切形成的片段，393 bp 为杂交形成的homo-duplex DNA 片段，无酶切割位点，因此，片段大小不变。

阳性对照推荐用量： 10 μl 体系用量 200 ng (约 2 μl) 。

