



## 基因编辑基因型鉴定和定量试剂盒

### 产品内容

序号	试剂	体积	保存条件
1	gDNA 提取液	50 ml	室温
2	2xPCR Mix	1 ml	-20°C
3	PB 溶液	5 ml	室温
4	PCR 纯化柱	20 个	室温
5	纯化洗涤液	50 ml	室温
6	Cut buffer 2	1 ml	-20°C
7	Cut 酶	5 ml	-20°C
8	DNA maker (2K)	0.5 ml	4°C
9	10000x GelRed	0.1 ml	4°C

## 产品介绍

CRISPR 基因编辑技术在基础研究以及转化医学研究中应用广泛。如何快速判断该工具对目标基因组编辑是其进行基因敲除的关键，本产品包含一套可以快速检测该工具基因编辑基因型鉴定的流程和操作，适合对各种细胞、组织、哺乳动物、血浆和血清等样本中编辑效果进行快速鉴定检测。

## 操作过程：

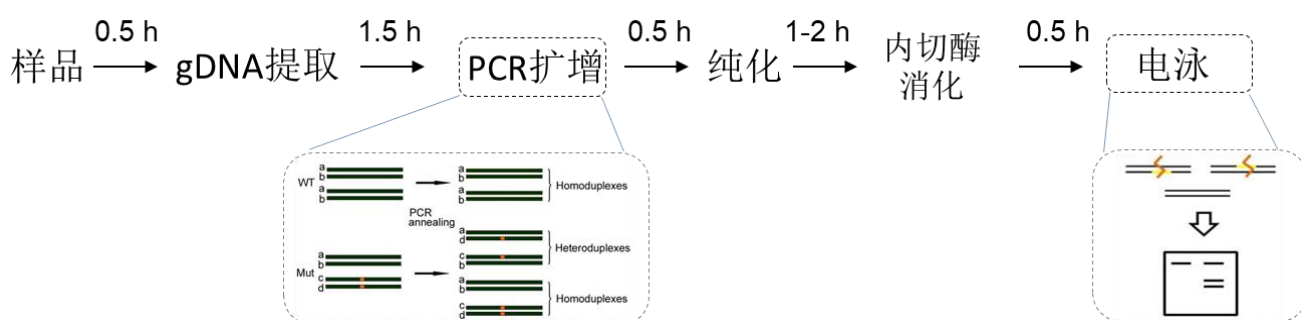


图 1：试剂盒操作流程示意图

### 1. 样品 gDNA 提取

- 1.1. 根据细胞量加入 gDNA 提取液，55°水浴 2-4 h，组织可能需要更长的时间（通常过夜），推荐 24 孔细胞加入 300ul，6 孔板加入 500ul；
- 1.2. 加入上述等体积的无水乙醇和 20%体积的饱和氯化钠溶液，12000x RPM 离心 5-8 min；此时会有白色絮状沉淀属于正常现象；
- 1.3. 去掉上清，加入 1ml 70%乙醇洗涤。于管低或管壁，注意千万别将白色絮状沉淀吸走；
- 1.4. 12000x RPM 离心 5 min，去掉上清，保留底部白色絮状沉淀，挥干乙醇残留液后，加入适量水，即得含 gDNA 的储存液。

## 2.PCR 扩增

ddH <sub>2</sub> O	16 μL
2xPCR Mix	20 μL
F+R	1.5 +1.5 μL
gDNA	1 μL
<b>Total</b>	<b>40.0 μL</b>

### PCR Thermocycler Program:

95°C for 3 min,  
35 cycles of [95°C 30 s, 72°C (1k bp/min), 72°C 30 s],  
72°C 5 min,  
95°C 5 min,  
4°C hold.

## 2. PCR 纯化:

- 2.1 将 PCR 产物与 2 倍体积的 PB 混合，并移入 PCR 纯化柱子中，12000x RPM 离心 0.5 min，弃去废液；
- 2.2 在离心柱中加入 700 ul 的纯化洗涤液，12000x RPM 离心 0.5 min，弃去废液，12000x RPM 空转 1 min；
- 2.3 向柱子中心加入 30 ul 的 55°C 预热的 ddH<sub>2</sub>O，12000x RPM 离心 1 min 即得 PCR 纯化产物；
- 2.4 用 NanoDrop 测定纯化的 DNA 的浓度。

## 3. 内切酶消化

纯化 DNA 产物	200-400 ng
10x Cut buffer	3 ul
Cut	2 ul
ddH <sub>2</sub> O	up to 30
<b>Total</b>	<b>30 ul</b>

注：37°C 进行酶切 2-4 h。

## 4.电泳分析

4.1 配置 1.5%的琼脂糖凝胶（配置时加入 10000x GelRed，最终浓度为 2x）进行电泳：120 V，30-60 min（具体时间可适当调整）；

4.2 结果分析：如图 2 所示，配置 1.5%的琼脂糖凝胶（PCR 产物 880bp），对 Cas9 编辑的基因型进行鉴定和半定量，Cas9 实验组出现编辑的条带表现，并根据条带灰度进行定量其编辑效率约 35%。

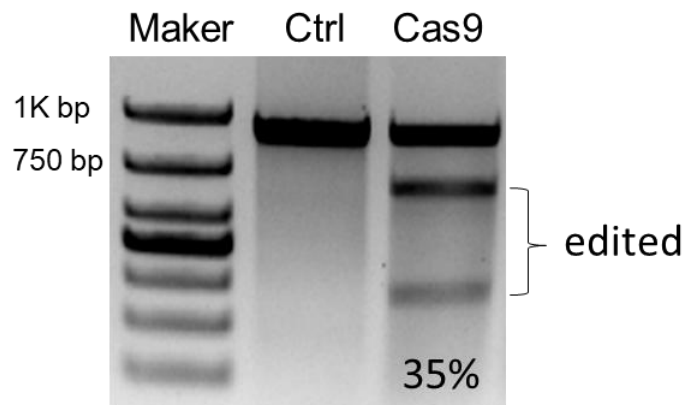


图 2. 对 Cas9 编辑的基因型进行鉴定和定量

## 注意事项

1. 扩增子最好设置在 500-1000 bp 以内。
2. PCR 产物务必为符合预期大小的单一条带。
3. 需要设置阴性对照。