

EZ-editor™单克隆基因型鉴定试剂盒（免抽提）使用说明书

产品简介

本试剂盒是专门针对基因编辑细胞株构建过程中的单克隆鉴定环节所开发的产品，能在单克隆生长早期即开始鉴定，提前筛选到合格的单克隆，不仅可缩短 2-4 周的实验周期，还减少了培养非阳性克隆的培养成本与人力。单克隆细胞基因组样品的制备只需 15-20 分钟，直接裂解细胞释放基因组，不需纯化即可直接进行下游的 PCR 实验，操作简便，还能进行 96 孔板高通量鉴定操作，同时鉴定上百个细胞样品。

优选的 PCR 试剂 CloneAmp Taq Mix (+Dye) 可以兼容粗提的基因组样品中残余的培养基和细胞裂解后的成分等可能会影响 PCR 反应的因素，配合上述核酸裂解液，能快速鉴定出单克隆细胞的基因型。

本试剂盒经过大量的内部测试，贴壁细胞与悬浮细胞均可用，人源细胞、小鼠细胞、大鼠细胞或是其他动物源性细胞均可适用。建议样品量为 $3 \times 10^3 \sim 10^5$ 个细胞（一般 96 孔细胞培养板为 1×10^4 / 孔），最低样品量不少于 30-50 个细胞。

此外，源井生物提供基因编辑靶位点鉴定引物的设计工具（EZ-editor™引物高效设计平台）与基因编辑样品测序结果判读工具（EZ-editor™基因型分析系统），帮助您轻松搞定基因编辑样本的基因型鉴定。

试剂盒组成

组分		YK-MV-100	YK-MV-250	YK-MV-1000	保存温度
MicroCell	Buffer A	10 mL	25 mL	100 mL	常温
DNA Lysis	Buffer B	1 mL	2.5 mL	10 mL	常温
PCR Validation	CloneAmp Taq Mix (+Dye)	1.25 mL	3.75 mL	12.5 mL	-20°C
	CloneAmp Ctrl	200 μ L	500 μ L	2 mL	-20°C



*试剂有效期为12个月，请注意试剂保存温度，MicroCell DNA Lysis Buffer A/B放-20℃开封后请按指示在室温存放。

■ 实验前准备

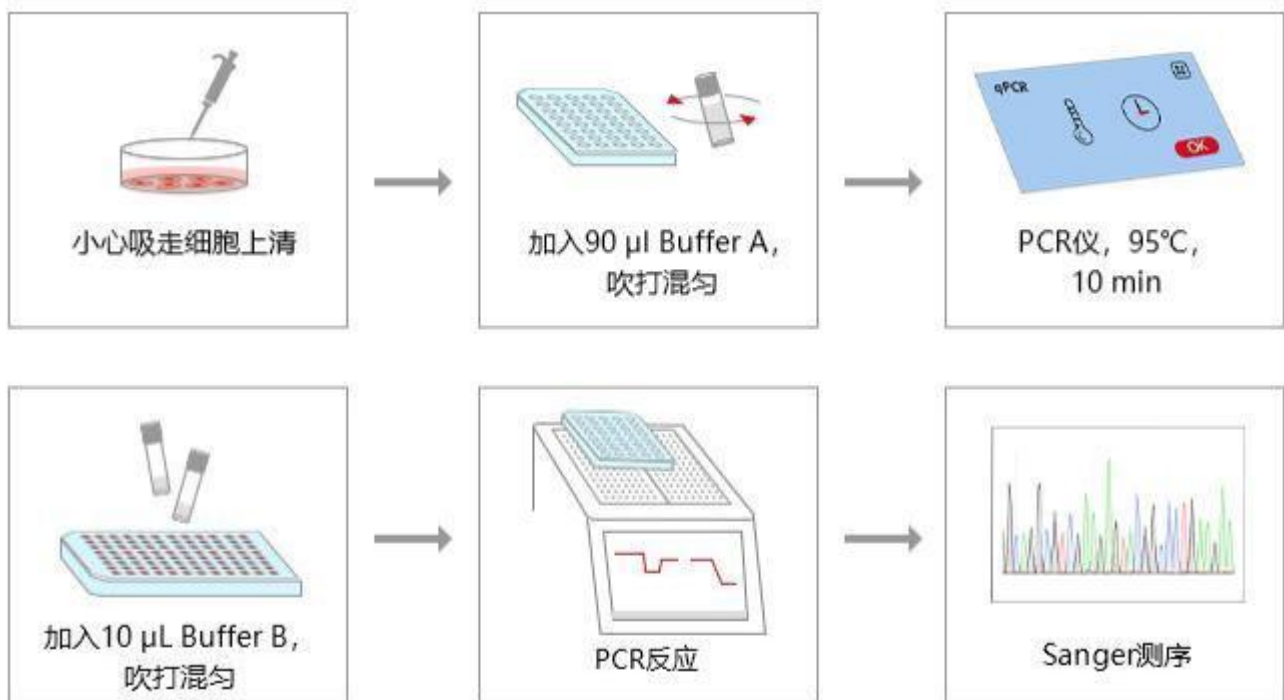
PCR 8 联管/96 孔 PCR 板

单道移液器/多道移液器

PCR 扩增仪

操作批量悬浮细胞需要准备台式离心机（配置酶标板转子）。

■ 单克隆鉴定操作图示



■ 制备单克隆细胞基因组样品

细胞处理

- 1 贴壁细胞：小心吸走细胞上清，尽量将上清吸取干净。
- 2 悬浮细胞：若悬浮细胞在 EP 管中，可直接放入小型离心机中，3000 rpm 常温离心 10 min，小心吸走上清。若悬浮细胞在 96 孔细胞培养板中，可将其直接放到台式离心机中 3000 rpm 常温离心 10 min，小心吸走上清。

*选做：加 PBS 洗涤细胞，3000 rpm 常温离心 5-10 min，此步骤可减少样品中的杂质，但如果细胞量较少，可不做此步。



细胞裂解

- ① 每个细胞样品中加入 90 μl MicroCell DNA Lysis Buffer A，吹打混匀 10-15 次。
- ② 将上一步样品转移至 96 孔 PCR 板，盖上硅胶膜；或者转移到 8 联管中，加盖密封。
- ③ PCR 仪设置好程序，95°C，10 min，样品上机。

终止裂解

从 PCR 仪上取下裂解好的样品，加 10 μl MicroCell DNA Lysis Buffer B，吹打混匀。样品可保存在负 20°C 或直接用于做下游 PCR 反应。

PCR 鉴定

将 CloneAmpTaq Mix (+Dye) 和 CloneAmp Ctrl 从 -20°C 冰箱取出，放置在冰盒中融解，按照下表配制 PCR 体系：

表 1. 实验样品配制体系

试剂	体积 (每反应)
CloneAmp Taq Mix (+Dye) , 2x	12.5 μL
单克隆细胞裂解产物	2 μL
鉴定引物 F (10 μM)	1 μL
鉴定引物 R (10 μM)	1 μL
ddH ₂ O	8.5 μL
总体积	25 μL

表 2. PCR 对照配制体系



试剂	体积 (每反应)
CloneAmp Taq Mix (+Dye) , 2x	12.5 μ L
单克隆细胞裂解产物	2 μ L
CloneAmp Ctrl	2 μ L
ddH ₂ O	8.5 μ L
总体积	25 μ L

注：鉴定引物需根据基因编辑靶位点的位置和敲除大小进行设计，可从源井生物自主开发的 **EZ-editor™引物高效设计平台** 轻松获得。PCR 对照体系扩增出来的条带大小约为 330 bp。

PCR 反应程序如下表：

表 3. PCR 鉴定程序

步骤	温度	时间	循环
预变性	95°C	3 min	1 cycle
循环扩增	95°C	15 s	35~40 cycles
	60°C	15 s	
	72°C	1 min/kb	
延伸补偿	72°C	5 min	1 cycle

PCR 产物可直接点样跑琼脂糖凝胶（不需加 Loading Buffer），或者送 Sanger 测序。测序结果可使用源井自主开发的 **EZ-editor™基因型分析系统** 进行判读。

实验案例



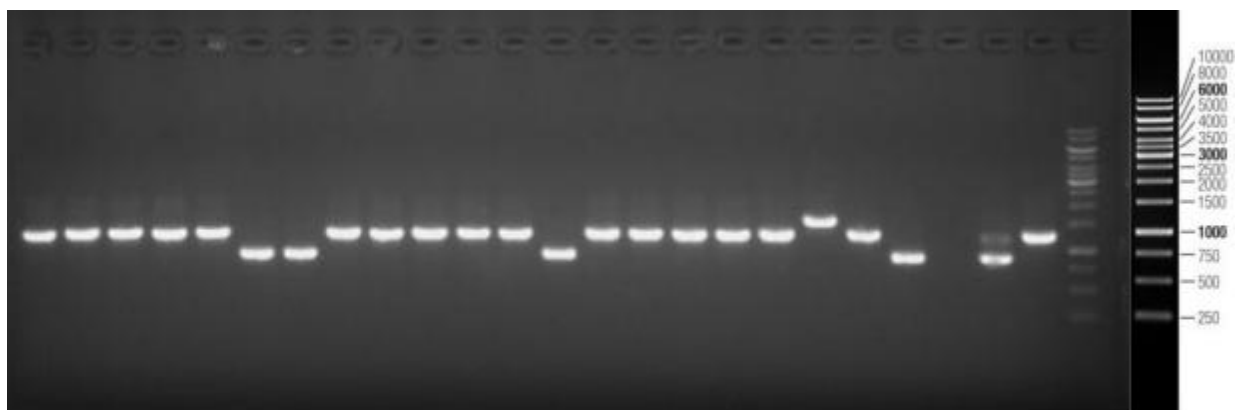


图 1. 该图是 Raw264.7 细胞 Cd180 基因敲除项目的单克隆初检结果，共筛选到 4 个阳性克隆（KO 理论大小约 902bp），1 个杂合克隆（两个条带，KO 理论大小约 902bp，WT 理论大小 1284bp）。本实验中 PCR 反应所需的 DNA 模板，是由微量细胞核酸裂解液对 96 孔单细胞进行裂解后获得，胶图中的扩增条带明亮且单一，说明本产品获得的 DNA 模板足够用于基因型鉴定，且扩增效果良好。

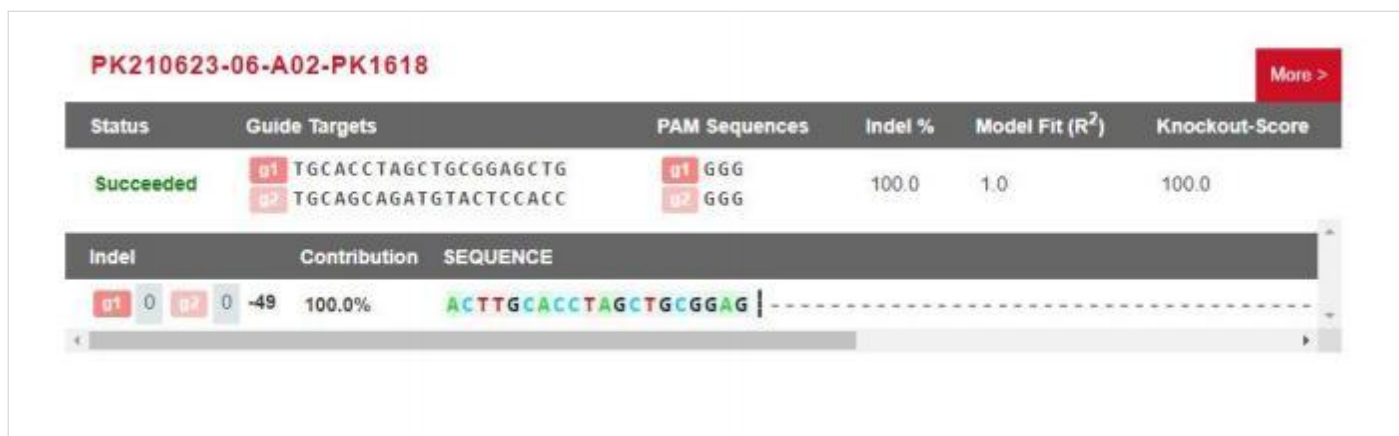


图 2. 该图是一个敲除项目单克隆的测序判读结果，将基因编辑单克隆测序结果与野生型细胞的测序结果导入 EZ-editor 基因型分析系统中，加上 gRNA 序列，系统将会自动分析基因编辑单克隆的基因型情况。图中所示克隆的基因型为敲除 49 bp 的纯合 KO。

常见问题

① 如果细胞量少于 3×10^3 个，MicroCell DNA Lysis Buffer 还是按照上述说明的量来处理细胞吗？

如果细胞量少，可以尝试减少 MicroCell DNA Lysis Buffer A 至 10 μ L~50 μ L，同时 MicroCell DNA Lysis Buffer B 需要等比例减少，使单克隆细胞裂解产物浓度为 25 个细胞/ μ L。同时为了保证 PCR 的产量，做 PCR 时，单克隆细胞裂解产物的量可调整到 5 μ L。



② 能否处理 48 孔板，24 孔板，12 孔板或更多细胞量的样品？

上述样品均可用此试剂盒处理，只需按比例增加 MicroCell DNA Lysis Buffer A 的用量，同时 MicroCell DNA Lysis Buffer B 需要等比例增加。

③ 可以使用其他的 PCR 酶进行鉴定吗？

本试剂盒 MicroCell DNA Lysis Buffer 处理后的样品为粗提核酸样品，便于进行微量细胞的基因组提取和高通量操作，但由于未经过纯化，不能兼容所有的 PCR 试剂，推荐配套的 PCR 鉴定试剂 CloneAmp Taq Mix (+Dye)。

④ CloneAmp Ctrl 的作用是什么？

做 PCR 的阳性对照，确定 PCR 体系配制和操作是否有问题。此对照主要针对人源细胞，小鼠细胞和大鼠细胞模板，其他种属的细胞不可用。

⑤ 高 GC 序列扩增失败时如何调整？

在 PCR 体系中添加 GC Buffer 或者 DMSO 等变性剂，帮助打开模板链，降低 PCR 扩增难度。

⑥ PCR 扩增无条带，怎么分析？

首先看对照组是否能扩增出条带，若对照组可扩增出条带，则模板（单克隆细胞裂解产物）是没有问题的，可能是实验组引物的问题，或者 PCR 条件需要调整。

若对照组扩增也是无条带的，有可能是 PCR 体系配制或者程序设置出问题，可重复一次实验，仅需做对照组验证，模板设置不同的量，如 0.5 μ L, 1 μ L, 2 μ L, 5 μ L。若在确保 PCR 体系无误，程序正确的情况下第二次扩增对照组仍旧有问题，则可能是模板（单克隆细胞裂解产物）出现问题。此时需要重新制备模板。

