

Cruiser[®] 基因敲除检测错配酶说明书

(Special for ZFN, TALEN and CRISPR/Cas9)

Cat. No. GP0104,GP0105,GP0106

Protocol No. PT161121-1

November, 2016

(仅供科研使用)

南京市汉中门大街 301 号 01 栋 13 层 A 座

电话: +86-25-66776730

传真: +86-25-66776701

邮编: 210036

网址: www.genloci.com



订购&技术咨询

客服/订购	技术支持
Telephone: +86-25-66776730	Telephone: +86-18066095106
Fax: +86-25-66776701	Fax: +86-25-66776701
Web: www.genloci.com	Web: www.genloci.com
E-mail: sales@genloci.com	E-mail: service@genloci.com

目 录

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) 杂交 DNA 的准备 4

 2) Cruiser®基因敲除检测错配酶酶切筛选阳性克隆 4-5

V. 结果分析 6

 A. 混合样本分析 6

 B. 单克隆结果分析 6

VI. FAQ 7-10

VII. 附录 11

VIII. 参考文献 11

图

- Figure 1. 操作流程图
- 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

表

- Table1. Cruiser® 基因敲除检测错配酶组份列表

I. 组份列表

Cruiser® 基因敲除检测错配酶分 50 rxns、100 rxns 和 250rxns 共 3 种规格。

Table1. Cruiser® 基因敲除检测错配酶组份列表

产品组份	50 rxns (Cat.No.:GP0104)	100 rxns (Cat.No.:GP0105)	250 rxns (Cat.No.:GP0106)
Cruiser® 基因敲除检测错配酶	50 µL	100 µL	250 µL
Cruiser® 缓冲溶液 (5X)	150 µL	300 µL	600 µL
终止缓冲溶液 (6X)	150 µL	300 µL	600 µL
阳性对照 DNA (100ng/µL)	50 µL	100 µL	250 µL

贮存条件：将 Cruiser® 基因敲除检测错配酶、阳性对照 DNA 置于-20℃保存，且避免污染；

将终止缓冲溶液（6X）、Cruiser® 缓冲溶液（5X）置于 2~8℃。

保质期：以上条件下，保质期：6 个月。若-80℃保存，保质期一年。

※注意：产品组份 Cruiser® 基因敲除检测错配酶在-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。

- 高 G-C 缓冲溶液 (5X) (Cat.No.: GP0163)
- Cell Plaza® 单细胞培养板 (Cat.No.: GP5036)

III. 产品概要

Cruiser®基因敲除检测错配酶，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。吉锐生物根据 Cruiser®基因敲除检测错配酶的特性，自主研发出了两款产品：Cruiser®基因敲除检测试剂盒和 Cruiser®基因敲除检测错配酶。能简便高效的检测基因敲除效率和基因多态性，广泛应用于精确检测人、哺乳动物、细菌、真菌、病毒以及植物基因敲除情况，尤其适用于 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 实验中混合样本的突变效率的检测以及阳性克隆的筛选。

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：精准切割突变位点，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；
6. 高通量筛选：更加轻松地大量样本中筛选阳性克隆。

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。

※注意：对于初次使用本产品的实验者，建议先阅读 Cruiser® 基因敲除检测试剂盒的说明书（Protocol No. PT161120-1），了解实验中可能遇到问题的解决方法和建议。

以下是 Cruiser® 基因敲除检测错配酶的操作流程图：

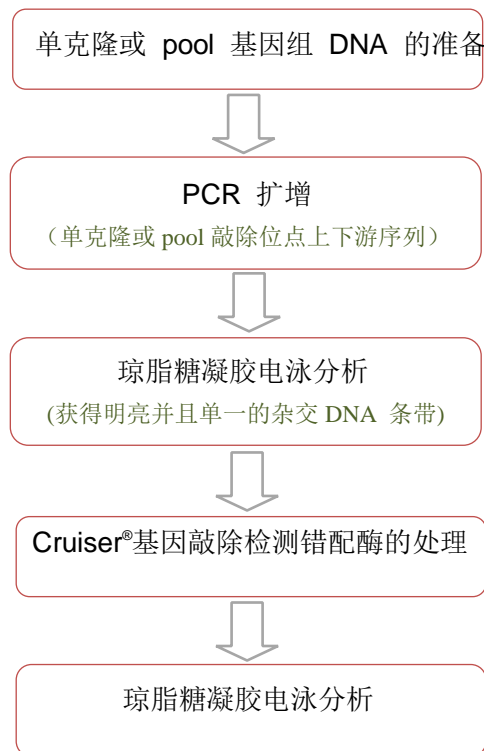


Figure1. 操作流程图

IV. 操作步骤

1. 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°C 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°C 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。

2. Cruiser® 基因敲除检测错配酶酶切筛选阳性克隆

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
Cruiser® 基因敲除检测错配酶	1μL
Cruiser® 缓冲溶液 (5X)	2μL
Add ddH ₂ O to	10μL

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

3) PCR 仪温度降至 4°C 后, 应立刻向上述 10μL 反应体系内加入 2μL 终止缓冲溶液 (6X), 随后进行琼脂糖凝胶电泳检测或置于 -20°C 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 (因为终止缓冲溶液 (6X) 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终止缓冲溶液 (6X), 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°C 后立即加入 loading buffer 置于 -20°C 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

Cruiser® 缓冲溶液 (5X)	2μL
Add ddH ₂ O to	9μL

2) 将 PCR 反应管置于 PCR 仪中 98°C 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°C 以下), 获得充分杂交的 DNA;

4) 向上述 PCR 反应管中直接加入 1 μ L Cruiser[®] 基因敲除检测错配酶, 45°C 孵育 20min 后, 立刻降至 4°C;

5) PCR 仪温度降至 4°C 后, 应立刻向上述 10 μ L 反应体系内加入 2 μ L 终止缓冲溶液 (6X), 随后进行琼脂糖凝胶电泳检测或置于 -20°C 保存。

※注意: 同 A 步骤。

V. 结果分析

阳性对照 DNA 为杂交后的 DNA 片段，经 Cruiser® 基因敲除检测错配酶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.）。

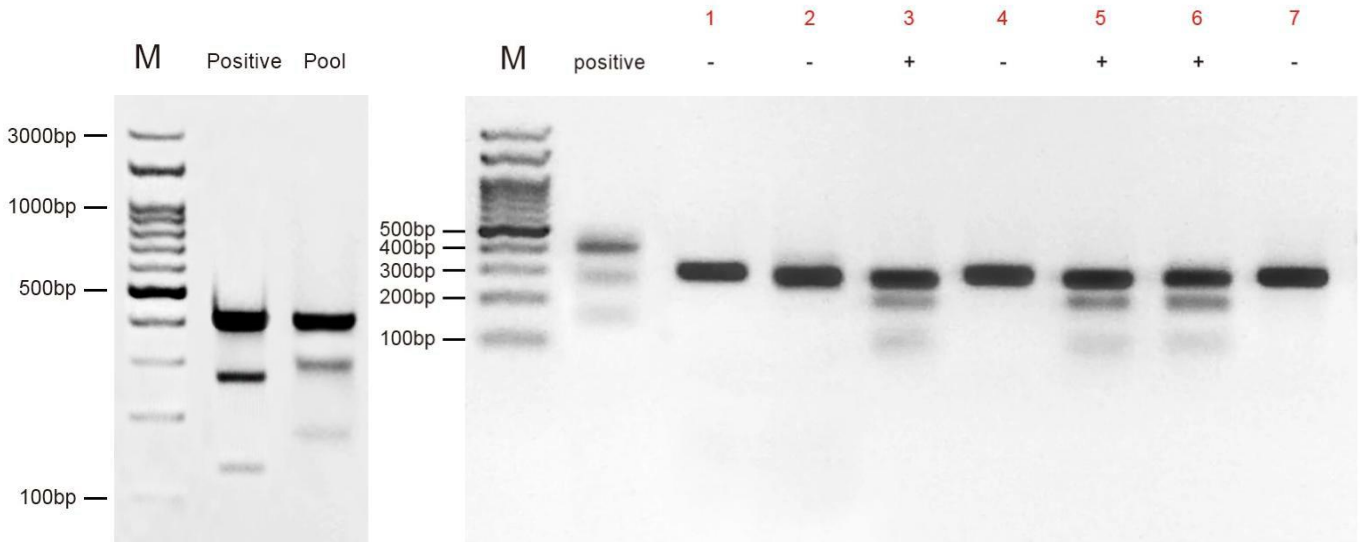


Figure 2. 阳性对照和 Pool 检测的电泳结果

Figure 3. K562 细胞中 Atg10 基因敲除案例

上图中，M: 100 bp-DNA Marker; Positive: 阳性对照 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 Figure4.），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 Cruiser®基因敲除检测错配酶酶切后产生的片段大小不同，则可以直接酶切（见下图 Figure5 .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。

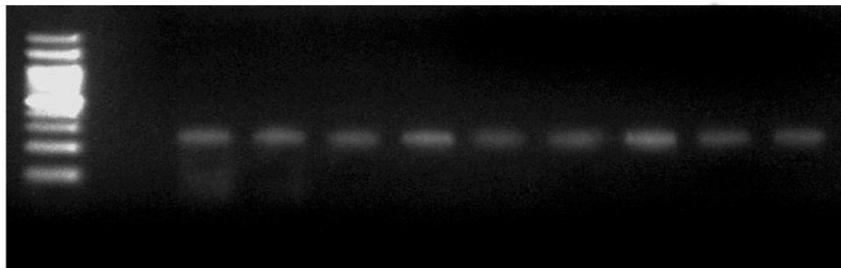


Figure 4. 扩增获得目的片段一轮 PCR（上）和二轮 PCR（下）电泳图

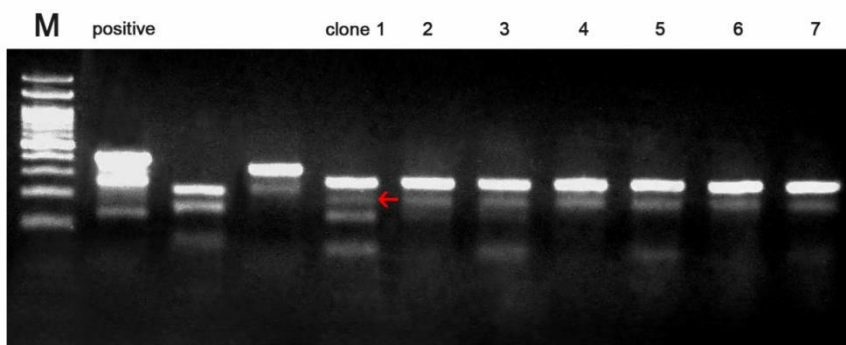


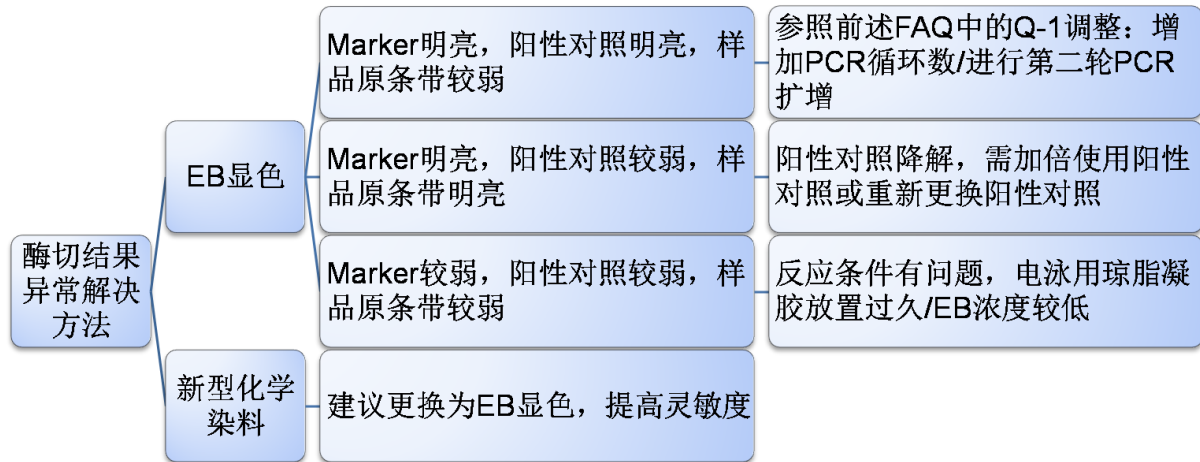
Figure 5. PCR 扩增目的片段有杂带，但不影响酶切的酶切电泳图

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：

a. 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；

b. 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。

c. 所使用 PCR 用酶体系与 Cruiser®基因敲除检测错配酶反应体系冲突，建议选购 Cruiser®基因敲除检测试剂盒。

d. 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（10μL 的酶切体系所加的底物量最多不超过 7μL，所用 Cruiser®基因敲除检测错配酶 1μL 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？

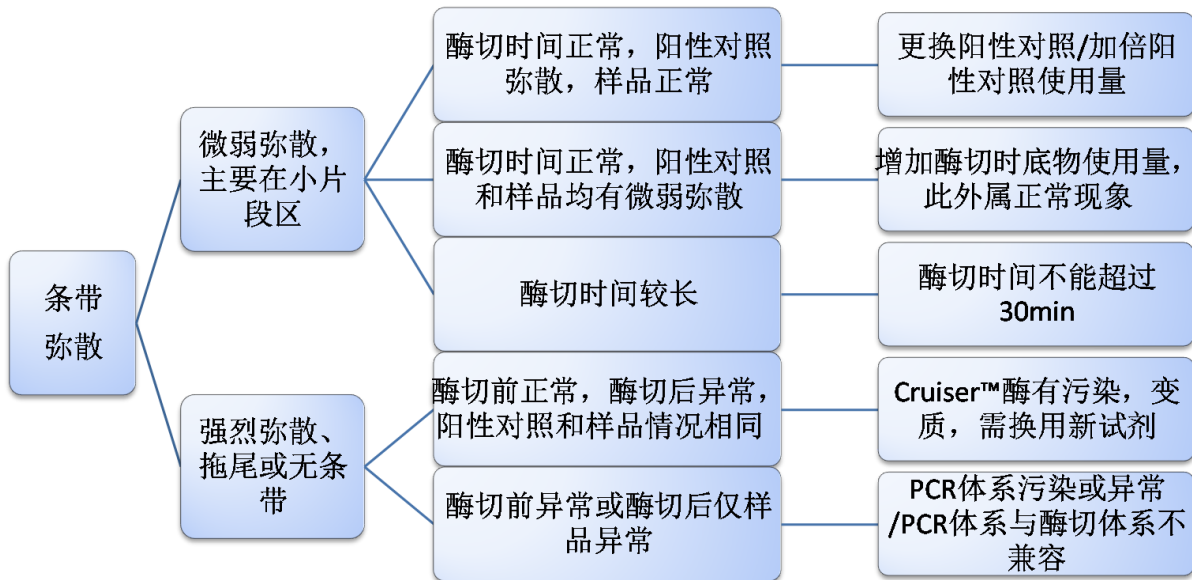
A-4: 该现象可能原因如下：

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：

- 1、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；
- 2、琼脂糖凝胶放置过久，推荐使用新配置的胶；
- 3、样品有核酸酶污染；
- 4、反应体系中 Mg²⁺ 的含量不足时，此时可以每 10μL 加入 3μL Cruiser® 缓冲溶液（5X）；

5、酶切反应结束要先等 PCR 仪温度降到 4℃ 后立即拿出加 2μL 终止缓冲溶液 (6X)，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，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 2μL 增加至 5μL，最多不超过 7μL（以 10μL 酶切体系不变）
- ④增加样品 DNA 浓度：PCR 反应再扩增一轮。

Q-7: Cruiser® 基因敲除检测错配酶检测结果是否会出现假阳性？

A-7: Cruiser® 基因敲除检测错配酶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 Cruiser® 基因敲除检测错配酶或 *CelI* 会出现假阳性。

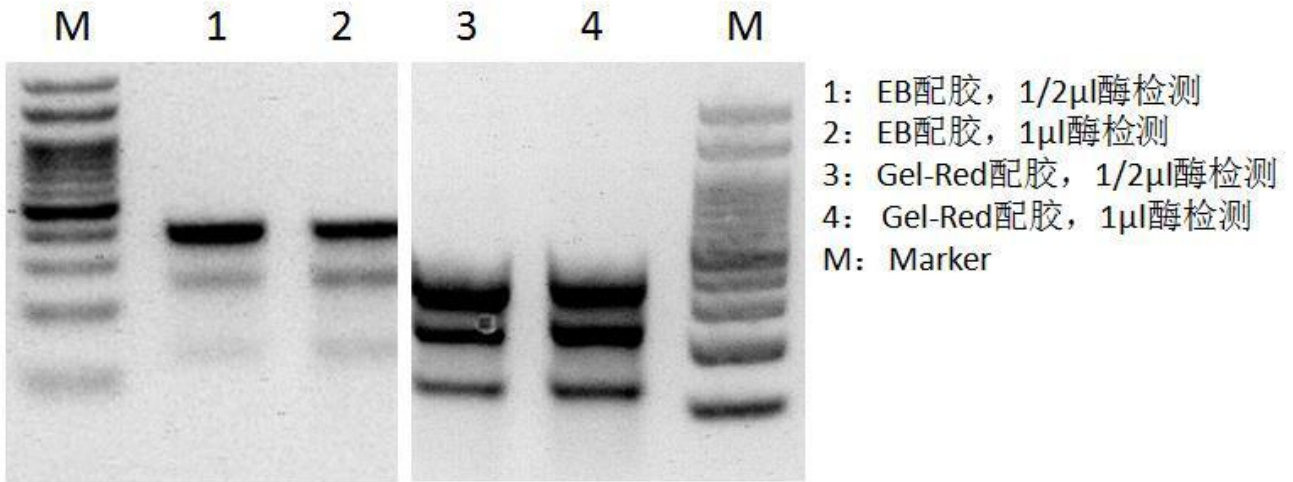
Q-8: 酶切后，电泳结果中酶切条带大小与预期一致，就一定是纯合子吗？

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: Cruiser[®] 基因敲除检测错配酶与新型化学染料的兼容性?

A-9: Cruiser[®]基因敲除检测错配酶在使用过程中，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：Gel-Red。经过测试，其与我们的 Cruiser[®] 基因敲除检测错配酶是兼容的，而且染色效果不逊于 EB，见下图：

Cruiser酶切



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°C 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 2bp, 如下图所示。经 Cruiser® 基因敲除检测错配酶切割后形成三个明显片段, 分别为 393bp、134bp、259bp, 其中 134bp、259bp 为酶切形成的片段, 393bp 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)。



VIII. 参考文献

1. Yang B, Wen X, Kodali N S, Oleykowski C A, Miller C G, Ku-linski J, Besack D, Yeung J A, Kowalski D, Yeung A T. Purification, cloning, and characterization of the *CEL I* nuclease. *Bio-chemistry*, 2000, 39: 3533~3541.
2. Perry J A, Wang T L, Welham T J, Gardner S, Pike J M, Yoshida S, Parniske M. A TILLING reverse genetics tool and a accessible collection of mutants of the legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 2003, 131: 866~871.
3. McCallum C M, Comai L, Greene E A, Henikoff S. Targeting Induced Local Lesions IN Genomes(TILLING) for Plant Functional Genomics. *Plant Physiology*, 2000, 123: 439~442.
4. Oleykowski C A, Mullins C R B, Godwin A K Yeung A T. Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26: 4597~4602.
5. Wienholds E, Eeden F V, Kosters M, Mudde J, Plasterk R H A, Cuppen E. Efficient target-selected mutagenesis in Zebrafish. *Genome Research*, 2003, 13: 2700~2707.
6. Till B J, Burtner C, Comai L, Henikoff S. Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32: 2632~2641.

