

# EZ-editor™ 高效能单克隆基因型鉴定试剂盒 (免抽提) 使用说明书

## High-performance monoclonal validation kit (extraction free)

### 产品简介

本试剂盒为 EZ-editor™ 单克隆基因型鉴定试剂盒 (免抽提) 的强化版, 专门解决长片段和复杂序列鉴定难的问题, 具备微量、高效与精准三大优势。使用时最低样品量可达 30-50 cells, 轻松实现 96 孔板上高通量鉴定上百个细胞样品; 直接裂解细胞样品释放基因组, 快至 15 mins 即可完成单克隆细胞基因组样品的制备, 无需抽提与纯化 DNA 即可用于 PCR 实验, 操作简便, 高通量操作更高效!

另外特研的 PCR 试剂 CloneAmp LA Mix (+Dye) 不仅可以高度兼容粗提基因组样品中残余的培养基和其余细胞裂解成分等可能会影响 PCR 反应的因素, 还具有极高的扩增效率, 以 MicroCell DNA Lysis 处理的细胞裂解液为模板, 可在 1.5 h 内扩增出 10 kb 的基因片段, 最终高效实现单克隆细胞基因型的精准鉴定。

本试剂盒经过大量的测试与优化, 不论贴壁与悬浮细胞, 人源细胞、小鼠细胞、大鼠细胞等所有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  $1 \times 10^4$ /孔), 最低样品量不少于 30-50 个细胞。此外, 源井生物提供独家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), 海量实验数据自动处理分析, 让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-MVH-50	YK-MVH-100	YK-MVH-250	保存温度
MicroCell DNA Lysis	Buffer HpA	5 mL	10 mL	25 mL	常温
	Buffer HpB	0.5 mL	1 mL	2.5 mL	常温
PCR Validation	CloneAmp LA Mix (+Dye)	625 $\mu$ L	1.25 mL	3.125 mL	-20°C
	CloneAmp Ctrl	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L	500 $\mu$ L	-20°C



	GC Buffer	250 $\mu$ L	500 $\mu$ L	1.25 mL	-20°C
--	-----------	-------------	-------------	---------	-------

\*试剂有效期: CloneAmp LA Mix (+Dye) 有效期 6 个月, 其他试剂有效期为 1 年。

\*GC Buffer 可用于高 GC 特征序列的扩增, 25  $\mu$ L 的体系中加 5  $\mu$ L。

## 实验前准备

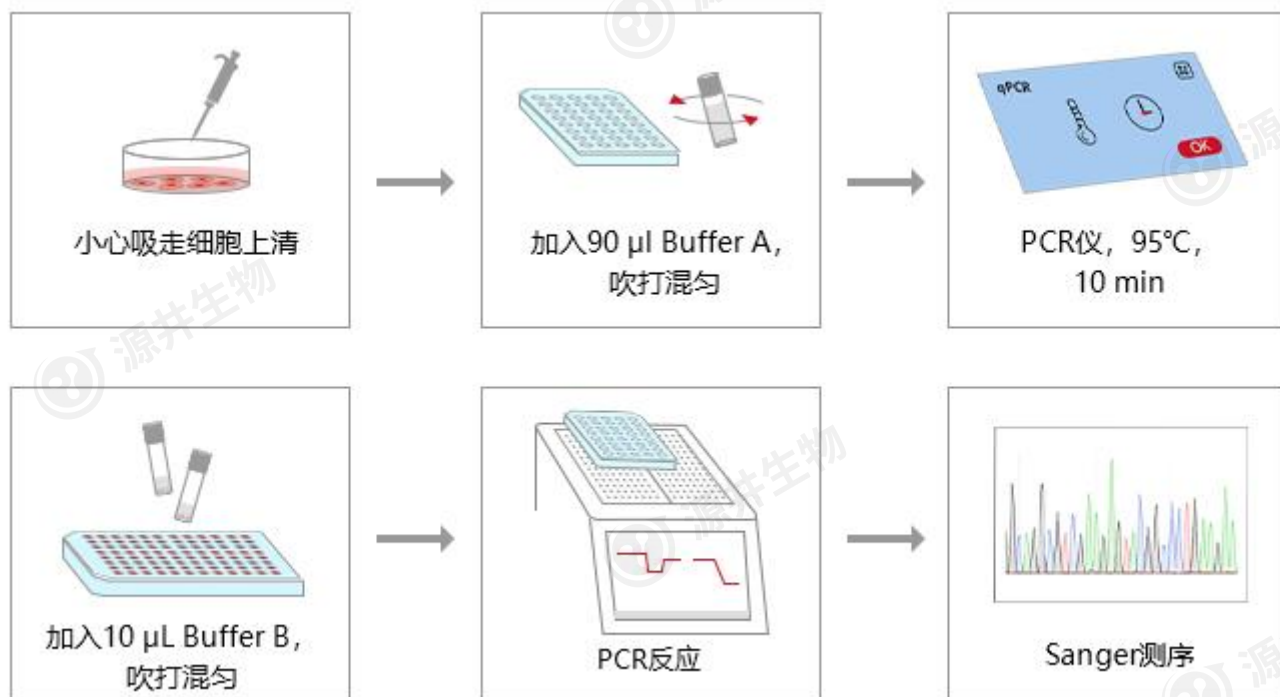
PCR 8 联管/96 孔 PCR 板

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  $\mu\text{L}$  MicroCell DNA Lysis Buffer HpA，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  $\mu\text{L}$  MicroCell DNA Lysis Buffer HpB，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 CloneAmp LA 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 LA Mix (+Dye), 2x	12.5 $\mu\text{L}$
单克隆细胞裂解产物	2 $\mu\text{L}$
鉴定引物 F (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{L}$
鉴定引物 R (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	8.5 $\mu\text{L}$
总体积	25 $\mu\text{L}$

表 2. PCR 对照配制体系



试剂	体积 (每反应)
CloneAmp LA Mix (+Dye) , 2x	12.5 μL
单克隆细胞裂解产物	2 μL
CloneAmp Ctrl	2 μL
ddH <sub>2</sub> O	8.5 μL
总体积	25 μL

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	<b>7sec/kb</b>	
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



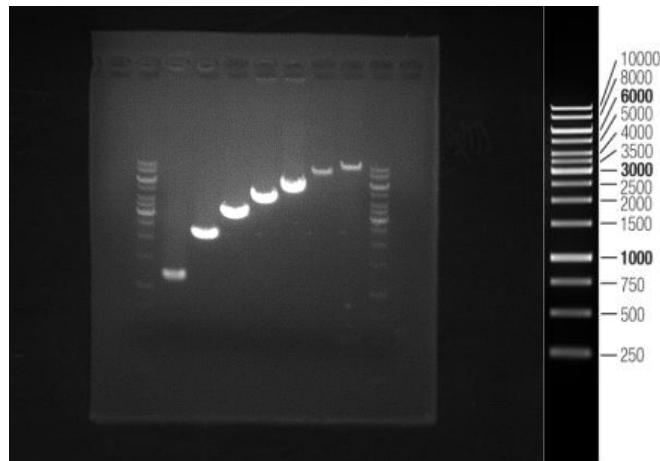


图 1. 是对不同长度模板进行 PCR 扩增的结果，取 5  $\mu\text{L}$  进行电泳，目的条带大小分别为 1200 bp, 2000 bp, 3000 bp, 4000 bp, 5000 bp, 8000 bp, 10000 bp。胶图中的扩增条带明亮且单一，扩增效能卓越，基因组 DNA 可不经提纯直接作为 PCR 模板，且最大能扩增 10000 bp 的条带。

## 常见问题

### ① 如果细胞量少于 $3 \times 10^3$ 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 HpA 至 10  $\mu\text{L}$ ~50  $\mu\text{L}$ ，同时 MicroCell DNA Lysis Buffer HpB 需要等比例减少，使单克隆细胞裂解产物浓度为 25 个细胞/ $\mu\text{L}$ 。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  $\mu\text{L}$ 。

### 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 HpA 的用量，同时 MicroCell DNA Lysis Buffer HpB 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 LA 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 (本试剂盒有提供, GC Buffer 为 5×, 即 25 μL PCR 体系中需加 5 μL) 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 μL, 1 μL, 2 μL, 5 μL。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。

