

## Genome Editing Mutation Detection Kit

### 产品概述

本品是一种可靠、快速的基于 T7 Endonuclease I (T7EI) 的用于检测基因组 DNA 在基因编辑后发生突变的试剂盒。本品包括基因组 DNA 提取、高保真 PCR 扩增、变性退火和 T7EI 酶切的全套试剂。

### 产品组成

试剂盒组成		FZ021-05	FZ021-25
		5T	25T
Part I	Buffer GL1	1 mL	5 mL
	Buffer GL2	1 mL	5 mL
	Buffer GW1	1.3 mL	6.5 mL
	Buffer GW2	1.5 mL	7.5 mL
	Nuclease-free Water	1 mL	5 mL
	DNA Collection Column	5 T	25 T
Part II	Proteinase K	100 $\mu$ L	500 $\mu$ L
	Control Template	5 $\mu$ L	10 $\mu$ L
	Control Primer Mix	5 $\mu$ L	10 $\mu$ L
	2 $\times$ High-fidelity PCR Premix	50 $\mu$ L	250 $\mu$ L
	T7 Endonuclease I (10 U/ $\mu$ l)	5 $\mu$ L	25 $\mu$ L
	10 $\times$ T7 buffer	10 $\mu$ L	50 $\mu$ L

### 储存条件

Part I 保存于常温 (15~30°C)，Part II 保存于 -20°C。

### 注意事项

**试剂盒使用前，请在 Buffer GW1 中添加乙醇，加入量请参照试剂瓶上标签。**

**试剂盒使用前，请在 Buffer GW2 中添加乙醇，加入量请参照试剂瓶上标签。**

使用前请检查 Buffer GL1 和 Buffer GL2 是否出现结晶或沉淀，如有结晶或沉淀，请将 Buffer GL1 和 Buffer GL2 置于 56°C 水浴重新溶解。

### 操作步骤

#### 1. 基因组 DNA 提取

1.1 培养的细胞应先处理为细胞悬液（最大提取量为  $5 \times 10^6$  个细胞），2000 rpm (400 xg) 离心 5 分钟，弃尽上清，加 200  $\mu$ l Buffer GL1。

1.2 加入 20  $\mu$ l Proteinase K 溶液，混匀。

1.3 加入 200  $\mu$ l Buffer GL2，涡旋振荡充分混匀，56°C 水浴 10 分钟

1.4 短暂离心以去除管盖内壁的水珠。加入 200  $\mu$ l 无水乙醇，涡旋振荡充分混匀，短暂离心

注：加入 Buffer GL2 和无水乙醇后要立即涡旋震荡混匀。

加入 Buffer GL2 和无水乙醇后可能会产生白色沉淀，不会影响后续实验。

1.5 上一个步骤中所得溶液全部加入到 DNA Collection Column 的吸附柱中。13400 xg 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

1.6 向吸附柱中加入 500  $\mu$ l Buffer GW1 (**使用前检查是否已加入无水乙醇**)，13400 xg 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

1.7 向吸附柱中加入 500  $\mu$ l Buffer GW2 (**使用前检查是否已加入无水乙醇**)，13400 xg 离心 1 分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

1.8 13400 xg 离心 2 分钟，倒掉收集管中废液。

1.9 将吸附柱置于一个新的离心管（自备）中，向吸附柱的中间部位悬空加入 50  $\mu$ l Nuclease-free Water，室温放置 2 分钟，13400 xg 离心 1 分钟，收集 DNA 溶液，-20°C 保存基因组 DNA。

#### 2. PCR 扩增

+86-18911183647

service@d-nano.cn

www.d-nano.cn



## 2.1 PCR 反应体系如下

组成	实验组	实验对照组	Positive Control	Blank Control
Genomic DNA	1~10 ng	1~10 ng	0	0
Control Template	0	0	2 $\mu$ L	0
Control Primer Mix	0	0	2 $\mu$ L	0
Target Primer Mix(5 $\mu$ M)	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	0	2 $\mu$ L
2 $\times$ High-fidelity PCR Premix	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
Nuclease-free Water	up to 20 $\mu$ L			
Total	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L

2.2 用移液器轻轻吹打混匀或轻微 Vortex 混匀，室温离心数秒，使液体积聚于管底

2.3 把配制好的 PCR 反应体系置于 PCR 仪上，开始 PCR 反应

2.4 PCR 反应参数的设置如下

Temperature	Time	Cycles
98 $^{\circ}$ C	10 sec	35
Tm*	5 sec	
72 $^{\circ}$ C	10 sec	
4 $^{\circ}$ C	Hold	-

注：请根据引物 Tm 值设置退火温度

2.5 PCR 结束后，每样取少量 PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测目的条带是否单一和大小是否正确，同时根据目的条带与 DNA Marker 的条带亮度对比，大概计算出 PCR 产物的量。

**注：扩增产物可直接用于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测，无需额外与 DNA loading buffer 混合。**

## 3. 变性与退火

3.1 按下表配制变性与退火体系

Component	Volume
PCR Product	200 ng
10X T7 Buffer	2 $\mu$ l
Nuclease-free Water	up to 19 $\mu$ l
Total	19 $\mu$ l

3.2 按照下表的步骤，在 PCR 仪上进行变性和退火

Temperature	Time
95 $^{\circ}$ C	5 min
95 $^{\circ}$ C-85 $^{\circ}$ C	-2 $^{\circ}$ C/sec
85 $^{\circ}$ C-25 $^{\circ}$ C	-0.1 $^{\circ}$ C/sec
4 $^{\circ}$ C	Hold

## 4. T7EI 酶切鉴定

在变性和退火完成后，每管加入 1  $\mu$ l 的 T7EI，吹打混匀。

37 $^{\circ}$ C 反应 15 min；

**注：如不立即进行电泳检测，需加入 1.5  $\mu$ l 的 0.25M EDTA 终止酶切反应。**

## 5. 凝胶电泳分析

将酶切产物使用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

