

EZ-editor™基因敲除试剂盒

■ 产品简介

本试剂盒为 EZ-editor™基因敲除试剂盒，是基于 CRISPR-U™ 系统，提供基因编辑全过程所需的主要试剂，旨在为科研工作者提供高效便捷的基因敲除工具，实现基因敲除细胞的一站式构建。

为达到高效敲除的目的，本试剂盒中的 3 条敲除载体 EZ-editor™ gRNA 均由源井红棉系统经高通量数据模拟运算后智能构建的，保障切割位点、切割效率和特异性等各参数达到综合最优。

为大大降低实验成本与缩短实验周期，本试剂盒针对基因编辑细胞实验中的单克隆鉴定环节所创新研发的产品 MicroCell DNA Lysis 和 PCR Validation，能在单克隆生长早期即开始鉴定，基因组样品的制备只需 15-20 分钟，无需纯化即可进行下游 PCR 实验，还能进行 96 孔板高通量鉴定操作，方便快捷。最终通过实现提前筛选出合格单克隆的目的，缩短了 2-4 周的实验周期，并大大减少培养非阳性克隆的培养成本与人力。优选的 PCR 试剂（PCR Validation）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，能快速准确地鉴定出单克隆细胞的基因型。

为方便后续实验的进行，本试剂盒中的所有特异性引物均是由 EZ-editor™引物高效设计平台设计 (https://www.rc-crispr.com/tools/primer_tool.html)，用户使用配套的 EZ-editor™基因型分析系统 (<https://www.rc-crispr.com/tools/gas.html>) 即可高效完成基因编辑样本的基因型鉴定。

■ 试剂盒组成

	组分	规格	储存温度
KO Plasmids	EZ-editor™ gRNA1	50 µg	-20°C
	EZ-editor™ gRNA2	50 µg	-20°C
	EZ-editor™ gRNA3	50 µg	-20°C
Transfection Control	EZ-editor™[scramble]gRNA	50 µg	-20°C
MicroCell DNA Lysis	Buffer A	10 mL	RT
	Buffer B	1 mL	RT
PCR Validation	CloneAmp Taq Mix (+Dye)	1.25 mL	-20°C



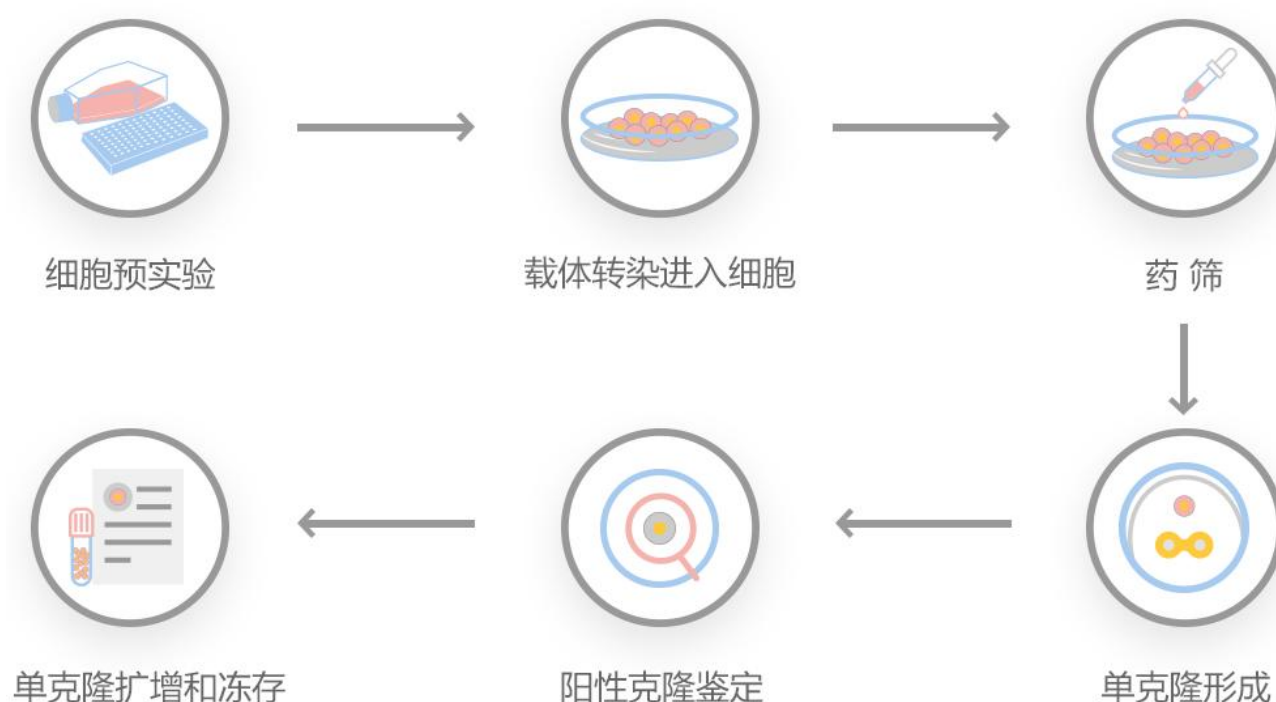
	CloneAmp Ctrl	200 μ L	-20°C
	Genotyping Primer F	500 μ L	-20°C
	Genotyping Primer R	500 μ L	-20°C

注：1. EZ-editor™ gRNA 和 TransF Ctrl 质粒为无内毒素质粒，浓度为 500 ng/ μ L。

2. Genotyping Primer 浓度为 10 μ M/L。

3. 基因型鉴定区域 GC 含量高的试剂盒会配有 500 μ L GC Buffer，25 μ L PCR 体系中加 5 μ L。

■ 基因敲除操作图示



■ 操作步骤

(一) 细胞预实验

1. 转染预实验

EZ-editor™试剂盒中的 TransF Ctrl 质粒带有绿色荧光 EGFP，可用于做转染条件摸索，便于正式实验的顺利开展。例图 1 中为 A375 细胞的转染测试结果，可判断出最佳转染方法为电转法，最佳电转条件为 20 号程序。



转染方法		荧光率	细胞活率
脂质体Lipo3000		10%	90%
电转法	6号程序	35%	90%
	9号程序	70%	90%
	20号程序	80%	90%

(图 1)

注: Lipo 操作参 https://tools.thermofisher.cn/content/sfs/manuals/lipofectamine3000_protocol.pdf, 上述电转法所用仪器为 Neon 电转仪, 程序为内置程序。

2. 药筛浓度摸索

① 将对数生长期的细胞消化成单细胞悬液并接种至 12 孔板中, 培养基总体积为 1mL/孔。将置于 12 孔板中的细胞放入 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 小时。

② 当汇合度达到 50%左右时, 将 12 孔板中的培养基换成含有不同浓度抗生素的药筛培养基, 比如 Puromycin, 浓度梯度为: 0, 1, 1.5, 2, 3, 4 μg/mL。

③ 2-3 天后镜下观察细胞, 选择细胞全致死的最低浓度作为后续实验的药物筛选浓度 (最佳药筛浓度)。

3. 单克隆形成条件摸索

① 将对数生长期的细胞消化成单细胞悬液, 进行细胞计数, 按接种梯度进行稀释。如接种梯度为 1 Cell/孔, 5 Cell/孔, 10 Cell/孔, 20 Cell/孔, 则需要取适量的细胞, 各稀释成 10 Cell/mL, 50 Cell/mL, 100 Cell/mL, 200 Cell/mL。

② 将稀释好的细胞接种至 96 孔板中, 每孔培养液总体积为 100 μL。细胞放入 37°C, 5% CO₂ 培养箱中静置培养。

③ 7-10 天后镜下观察细胞是否有增殖趋势并且形成细胞簇, 统计各组的单克隆数量, 选择单克隆形成数量最多的一组作为单克隆形成接种梯度。

4. 靶位点鉴定

为确保敲除载体 EZ-editor™ gRNA 的敲除效果, 建议先对 gRNA 靶向的位点进行测序验证。可使用试剂盒配套的试剂 MicroCell DNA Lysis 和 PCR Validation, 对靶位点进行扩增和测序, 然后将



测序结果与理论序列进行比对。若靶位点与理论序列相符，则可放心使用该敲除载体；若靶位点有突变，则需另换 gRNA。

（二）正式实验

1. 转染敲除载体（以 Neon 电转为例）

- ① 将对数生长期的细胞消化成单细胞悬液，取部分细胞进行细胞计数。
- ② 取 1×10^6 个细胞于无菌的 1.5 mL EP 管中， $300 \times g$ 离心 4 分钟，弃上清。
- ③ 加 1 mL PBS 重悬细胞， $300 \times g$ 离心 4 分钟，弃上清。
- ④ 细胞沉淀用 200 μ L Buffer R 重悬，加入 10 μ g 敲除载体 EZ-editor™ gRNA 混匀。
- ⑤ 电击杯中加入 3 mL Buffer E2，随后放入电转仪的卡槽。
- ⑥ 使用 100 μ L 电转枪头吸取细胞与质粒混合物，插入电击杯中，设置电转条件，开始电击。
- ⑦ 提示电转完成后，将细胞接种于加有预热培养基的 6 孔板中培养。
- ⑧ 重复⑥-⑦步操作，作为复孔。

2. 药筛

转染 24-48 小时后，镜下观察细胞活率和荧光率，更换成含 Puromycin (invivogen ant-pr-1) 的培养基进行筛选。抗生素浓度按照预实验浓缩的最佳药筛浓度，药筛时间为 1-5 天，不同细胞有差异，筛选至无荧光的细胞都被筛死即可停止加药，换回普通培养基，即为基因敲除 Pool。

3. Pool 切割效果检测

- ① 将 Pool 中 1 个复孔的细胞用 PBS 冲洗下来，离心收集细胞，弃上清。
- ② 按照 $1 \times 10^5 \sim 10^6$ Cell/mL MicroCell DNA Lysis 的比例加 MicroCell DNA Lysis BufferA 吹打混匀 10-15 次，裂解细胞。
- ③ 将上一步样品取 100 μ L 转移至 PCR 管中，PCR 仪设置好程序， 95°C ，10 min，样品上机。



④ 从 PCR 仪上取下裂解好的样品，加 10 μL MicroCell DNA Lysis Buffer B，吹打混匀。

⑤ 取 2 μL Pool 的裂解液做模板，按表 1 和表 2 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
Genotyping Primer F (10 μM)	1 μL
Genotyping Primer 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 μL
单克隆细胞裂解产物	2 μL
CloneAmp Ctrl	2 μL
ddH ₂ O	8.5 μL
总体积	25 μL

注：PCR 对照体系扩增出来的条带大小约为 330 bp。

⑥ PCR 上机反应，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

⑦ PCR 产物直接点样跑琼脂糖凝胶电泳（不需加 Loading Buffer），若 Pool 裂解产物 PCR 条带有与基因敲除后的理论调带相符的，则该 Pool 是有敲除效果的。若看 PCR 条带无法区分是否有切割效果，可将剩余 PCR 产物送测序，然后用源井自主开发的 **EZ-editor™基因型分析系统**进行判读。

4. 单克隆形成

- ① 将有切割效果的 Pool 细胞消化成单细胞悬液，进行细胞计数。
- ② 将细胞按照预实验中获得的最佳接种梯度对细胞进行稀释，后接种于 96 孔板中。此步骤推荐用源井生物的单克隆生长培养基。
- ③ 细胞放入 37°C，5% CO₂ 培养箱中静置培养 7-10 天后进行第一轮观察，标记有单克隆的孔。
- ④ 当克隆团长至一定大小后（不同细胞有差异），可将克隆团一分为二接种到 96 孔板中，一份做单克隆基因型鉴定，另一份继续培养。

5. 单克隆鉴定

5.1 制备单克隆细胞基因组样品

- ① 小心吸走单克隆的培养基，如果样品是悬浮细胞，需先离心将细胞离至管底，再弃培养基。
- ② 96 孔板每孔细胞加入 90 μL MicroCell DNA Lysis Buffer A，吹打混匀 10-15 次。
- ③ 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。
- ④ PCR 仪设置好程序，95°C，10 min，样品上机。



⑤ 从 PCR 仪上取下裂解好的样品，加 10 μ L MicroCell DNA Lysis Buffer B，吹打混匀。样品可保存在负 20℃或直接用于做下游 PCR 反应。

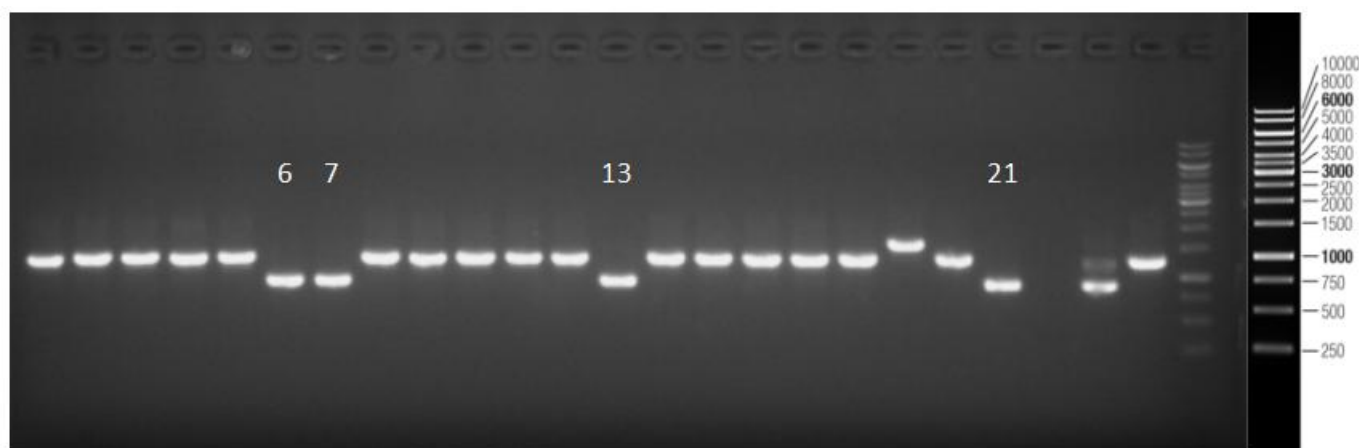
5.2 PCR 鉴定

① 将 CloneAmp Taq Mix (+Dye) 和 CloneAmp Ctrl 从-20℃冰箱取出，放置在冰盒中融解，按照下表 1 和表 2 配制 PCR 体系。

② PCR 上机反应，程序见表 3。

③ PCR 产物直接点样跑琼脂糖凝胶电泳（不需加 Loading Buffer），根据条带大小筛选出阳性克隆。

例. Raw264.7 细胞 Cd180 基因敲除项目的单克隆 PCR 鉴定



(图 2)

图 2 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）。应挑选 6，7，13，21 号克隆进行测序。

④ 阳性克隆送 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。若是移码方案，PCR 跑琼脂糖凝胶电泳区分不出来，则随机挑选克隆进行测序。

6. 阳性克隆扩增和冻存

将测序合格的单克隆进行传代扩增和冻存，或者继续进行下游实验。



■ 常见问题

① 3 条 gRNA 敲除载体是分开转染还是一起转?

EZ-editor gRNA 敲除载体是移码敲除的方案, 需注意 gRNA 靶向的位置, 若 3 条 gRNA 在同个外显子上, 可以 3 条 gRNA 敲除载体一起转染; 若 gRNA 靶向位置不在同一个外显子上, 建议分开单独转染。此外, 1 条 gRNA 敲除载体单独转染基因型比较简单, 容易分析; 3 条 gRNA 敲除载体共转, 敲除效果较好, 但筛到的克隆基因型也会比较复杂。

② 怎么判断细胞转染环节是否成功?

EZ-editor gRNA 敲除载体带有绿色荧光基因, 转染 24 小时后通过荧光显微镜可看到成功转进敲除载体的细胞带有绿色荧光标记, 根据细胞白光图和荧光图的对比, 可判断细胞的荧光率, 荧光率大于 40% 为佳。此外, EZ-editor gRNA 敲除载体带有 Puro 抗性, 方便对转染后的细胞进行筛选富集。

③ 3 条 gRNA 敲除载体一起转染细胞, 是否可设计同一对引物进行鉴定?

若 3 条 gRNA 载体在同个外显子上, 可用同一对引物进行鉴定; 若不在同个外显子上, 视 gRNA 之间的距离而定, 建议 PCR 片段不要超过 2kb。

④ 转染后细胞状态不好, 细胞汇合度低, 转染率也不高, 怎么调整?

先确保转染前细胞活性正常, 建议使用源井生物**转染专用培养基**, 再尝试调整转染条件, 比如转染细胞量, 质粒用量, 电转电压等。

⑤ 如何判断长起来的克隆是否为单克隆?

贴壁细胞比较好判断, 尤其是上皮样的细胞, 是成团克隆样生长, 接近圆形, 若是多个细胞生长起来的, 在 2 个克隆团的交接处边界会有凹陷或者边界不规则。96 孔中只有 1 个细胞团就算该孔的细胞为单克隆, 若有 2 个以上细胞团则为多克隆。

悬浮细胞在挪动的过程中比较容易被打散, 所以较难判断。悬浮细胞在形成克隆的时候也会有成团的现象, 故一般 96 孔中只有 1 个细胞团就算该孔的细胞为单克隆, 若有 2 个以上细胞团则为多克隆。若细胞是散点状的, 则无法区分是否为单克隆。

⑥ 单克隆形成困难, 接种梯度低克隆不长, 接种梯度高 (>30 Cell/孔) 能长克隆, 但很可能不是单克隆, 如何改善?

源井生物基于丰富的经验, 推出了一些经优化的单克隆生长培养基, 可有效提高细胞转染后的单克隆形成率。

