



IndelCheck™ CRISPR/TALEN 插入缺失检测体系

Cat. No. IC001

Cat. No. IC002

Cat. No. IC003

Cat. No. IC004

Cat. No. IC005

Cat. No. IC006

Cat. No. IC007

Cat. No. IC008

用户手册

广州高新技术产业开发区
广州科学城掬泉路3号
广州国际企业孵化器F区8楼
510663

电话：4006-020-200；020-32068595

传真：020-32052877

网址：www.igenebio.com

用户手册

IndelCheck™ CRISPR/TALEN 插入缺失检测体系

I. 技术简介.....	3
II. 试剂盒内容及储藏条件.....	5
III. 实验流程概览.....	7
IV. 实验步骤.....	8
1. 引物设计.....	8
2. 样品准备.....	8
3. 靶点PCR及产物处理.....	9
4. 解链和退火.....	10
5. T7 核酸内切酶 I 酶切检测.....	10
6. 凝胶电泳分析.....	11
7. 测序验证.....	11
8. Control Insert的连接.....	13
V. 疑难解析.....	15
VI. 附录.....	18
VII. 有限使用许可及质保声明.....	24

I. 技术简介

CRISPR/TALEN 介导的特异位点 DNA 双链断裂 (DSBs) 可被细胞的非同源末端连接 (NHEJ) 机制修复,而这种机制的修复常常会在 DSB 位点引入插入缺失突变。通过 PCR 对靶点区域的序列进行扩增,PCR 产物经过解链和退火后会就会形成带有错配的杂合 DNA (如野生型/插入缺失突变型错配,或 突变1/突变2型错配)。这些退火后的 PCR 片段与只识别和剪切错配的 DNA 双链的 T7 核酸内切酶 I 混合进行孵育。如果酶切产物跑胶出现两条长度如预期的较短条带,通常就意味着 CRISPR/TALEN 成功地在基因组靶点上引入了插入缺失突变。我们可以利用错配酶切对 CRISPR sgRNA 等基因组编辑工具进行功能验证 (图1),或是筛选 NHEJ 介导的基因敲除阳性的细胞株 (图2)。

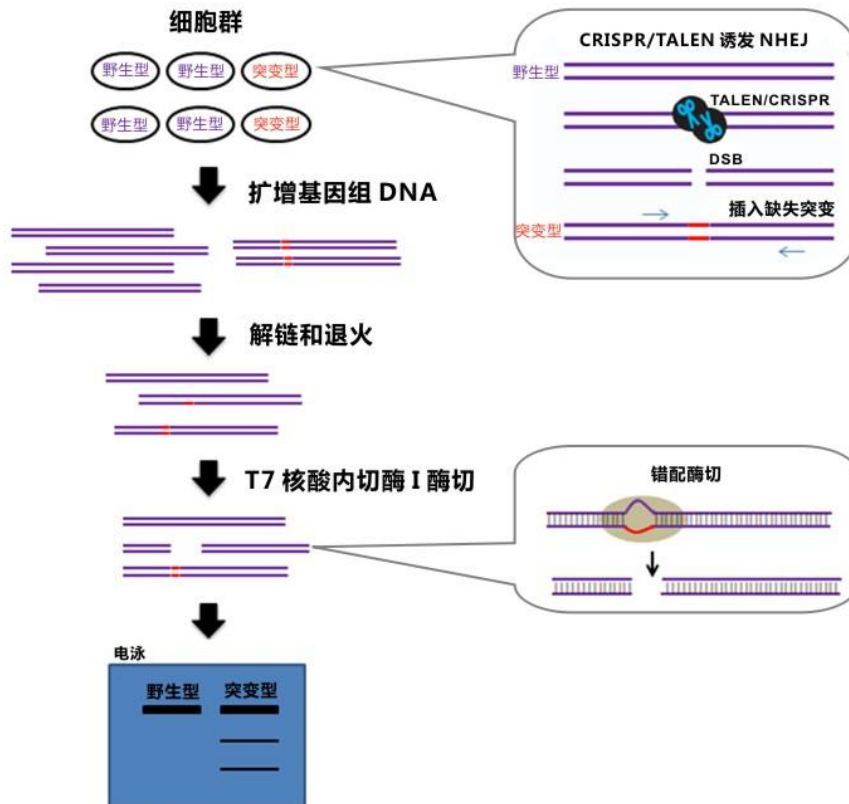


图 1. 使用错配酶切方法进行 CRISPR 或 TALEN 功能验证

IndelCheck™ CRISPR/TALEN 插入缺失检测体系 (IC001, IC002) 是一套设计用于验证基因组编辑工具功能或检测编辑阳性细胞的完整体系。它包括了靶点 PCR 试剂盒 (2.0版) (IC003, IC004)、T7 核酸内切酶 I 检测试剂盒 (IC005- IC006), 以及靶点 PCR 克隆试剂盒 (IC007, IC008)。试剂盒的所有组分都经过整体优化, 务求能在功能验证和阳性检测试验中获得最佳表现。

靶点 PCR 试剂盒 (2.0版) 为能实现高效的靶点 PCR 扩增进行过专门的优化。试剂盒含有专用的裂解缓冲液, 无需另外分离基因组 DNA 进行 PCR。试剂盒的 SuperHero PCR mix 能高效高保真地对靶点序列进行扩增, 生成的 PCR 产物适用于链接平端或黏端的多种测序载体。GeneCopoeia 也提供靶点 PCR 引物设计及合成服务。

T7 核酸内切酶 I 检测试剂盒包含 T7 核酸内切酶 I。T7 核酸内切酶 I 能识别并剪切杂合双链 DNA, 并切割错配碱基 5' 端的第一、第二或第三个磷酸二酯键。本试剂盒也提供靶点 PCR 和错配酶切的正对照。

IndelCheck™ CRISPR/TALEN 插入缺失检测体系

靶点 PCR 克隆试剂盒包含 T4 DNA 连接酶体系以及带有致死基因的平末端连接载体，能将靶点特异 PCR 产物克隆到已经线性化的载体上，方便对靶点区进行测序确证（图2）。本试剂盒也提供载体的 PCR 检测引物以及测序引物。

产品优势

- 简化您的 CRISPR/TALEN 功能验证、基因敲除克隆筛选以及序列确证。
- 靶点序列 PCR 扩增能力强大，无需分离基因组。
- 优化过的 T7 核酸内切酶 I 检测系统，含阳性对照，易于上手。

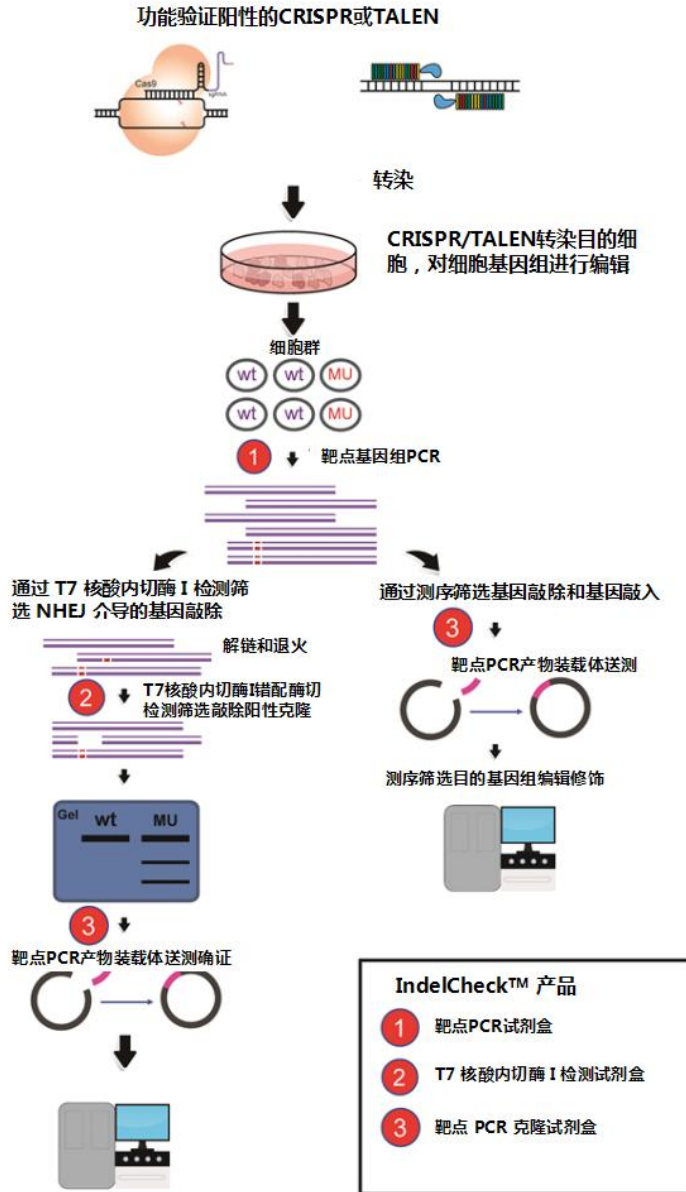


图 2. 使用全套 IndelCheck 试剂盒进行基因敲除/敲入筛选及靶点测序确证。

II. 试剂盒内容及储藏条件

IndelCheck™ CRISPR/TALEN 插入缺失检测体系 (IC001, IC002)

T7 核酸内切酶 I 检测试剂盒有两种规格：

50个反应 试剂盒 (Catalog No. IC005)

200个反应试剂盒 (Catalog No. IC006)

内容	总量 50 个反应 200 个反应	运输条件	储存条件
酶切反应试剂			
T7 Endonuclease I (2 U/μL)	50 μL 4×50 μL	冰袋	-20°C 下能稳定储存至少 12 个月
10× T7EN Buffer	100 μL 4×100 μL	冰袋	-20°C 下能稳定储存至少 12 个月
阳性对照试剂			
Control template & primer mix	100 μL 4×100 μL	冰袋	-20°C 下能稳定储存至少 12 个月

靶点 PCR 试剂盒 (2.0版)有两种规格：

50个反应 试剂盒 (Catalog No. No. IC003)

200个反应 试剂盒 (Catalog No. No. IC004)

内容	总量 50 个反应 200 个反应	运输条件	储存条件
Lysis Buffer	1300 μL 4×1300 μL	冰袋	-20°C 下能稳定储存至少 12 个月
2 × SuperHero PCR Mix	650 μL 4×650 μL	冰袋	-20°C 下能稳定储存至少 12 个月

靶点 PCR 克隆试剂盒有两种规格：

20 个反应 试剂盒（Catalog No. IC007）

100个反应 试剂盒（Catalog No. IC008）

内容	总量 20 个反应 100 个反应	运输条件	储存条件
5 × Ligase Buffer	40 μL 5 × 40 μL	冰袋&干冰	-20°C 下能稳定储存至少 12 个月
T4 DNA Ligase (200 U/μL)	20 μL 5 × 20 μL	冰袋&干冰	-20°C 下能稳定储存至少 12 个月
Blunt-end linear vector(20 ng/μL)	20 μL 5 × 20 μL	冰袋&干冰	-20°C 下能稳定储存至少 12 个月
Control Insert (40 ng/μL)	20 μL 5 × 20 μL	冰袋&干冰	-20°C 下能稳定储存至少 12 个月
Forward Sequencing Primer (20 μM)	250 μL 5 × 250 μL	冰袋&干冰	-20°C 下能稳定储存至少 12 个月
Reverse Sequencing Primer (20 μM)	250 μL 5 × 250 μL	冰袋&干冰	-20°C 下能稳定储存至少 12 个月

注意事项： .

收到试剂盒后请立即将所有组分储存在 -20°C，建议将各组分分装保存（特别是T4 DNA Ligase），请注意避免反复冻融。

其他所需实验材料

以下材料为实验所需，但并不随附试剂盒提供：

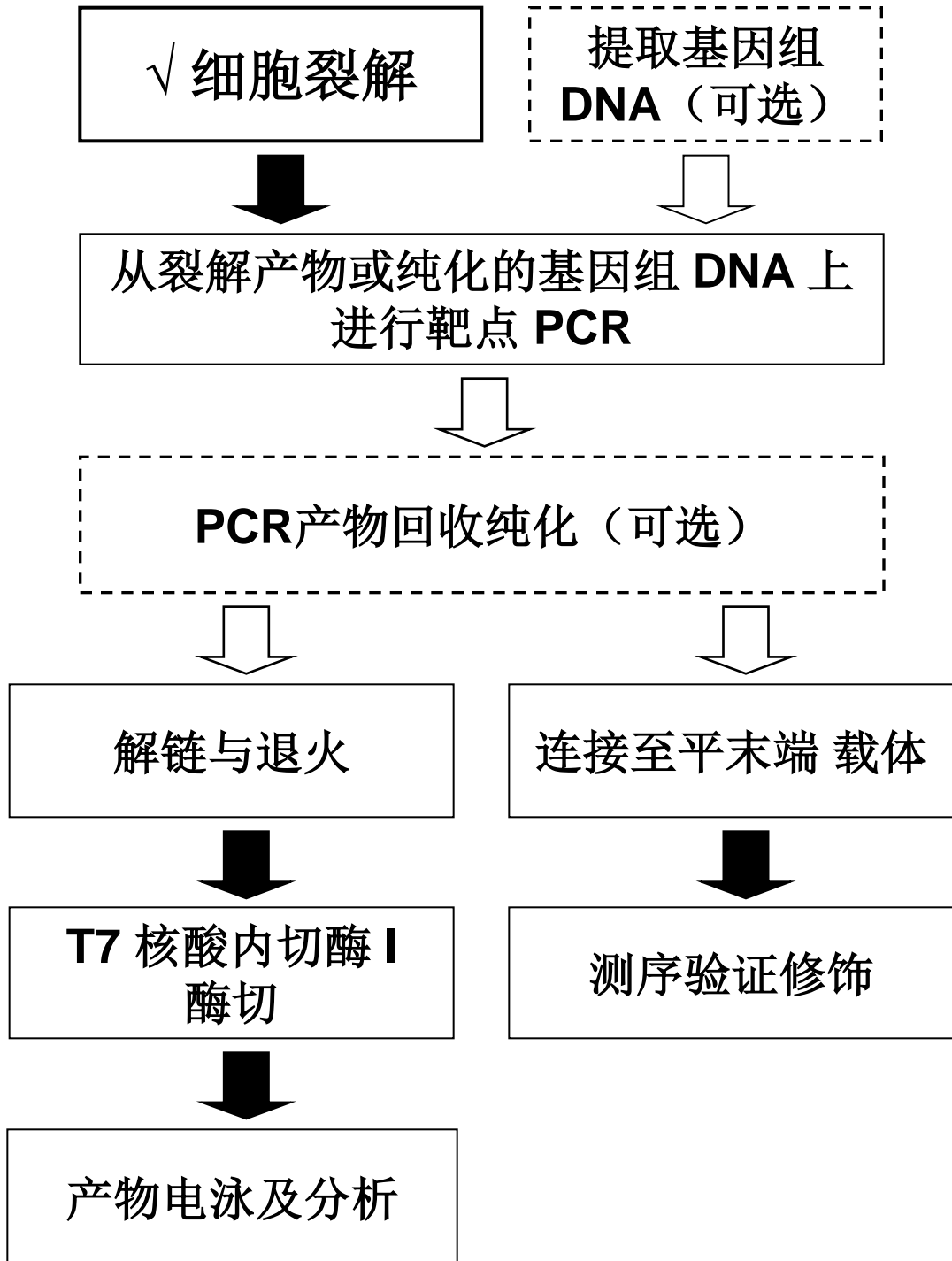
靶点特异 PCR 引物， $T_m \geq 60^\circ C$ ：引物应设计在 TALEN 或 sgRNA 靶点的两侧，扩增一段约为 500-800 bp 的片段，并使TALEN 或 sgRNA 的剪切位点位于偏离扩增片段中心约 100 bp 的位置。设计时应尽可能确保引物对于该靶点的特异性。避免使用含有次黄嘌呤的引物。设计时应避免扩增到潜在的 SNP 位点或等位基因存在序列差异的位点。

注：我们强烈建议您在进行引物设计和任何实验前先获取您所使用的细胞系基因组上的靶点序列信息。哺乳动物细胞通常是二倍体，等位基因间有可能存在序列差异。在设计靶点 PCR 引物时应避免扩增类似的位点，否则可能会导致 T7 核酸内切酶在消化阴性对照样本时发生误切。我们在附录 4 提供使用在线工具查阅潜在 SNP 位点的详细步骤。

***GeneCopoeia 也提供靶点特异 PCR 引物设计与合成服务。**

ddH₂O。避免使用高温高压灭菌过的 H₂O。高温高压灭菌锅内循环的蒸汽有时会带进污染物。污染物可能会对 PCR 产生干扰。

IV. 实验流程



IV. 实验步骤

本章节将为使用 IndelCheck™ CRISPR/TALEN 插入缺失检测体系验证 CRISPR sgRNA 或 TALEN 对染色体上基因组序列的酶切活性提供指引。

除了在前一章所展示的实验流程以外，我们也会提供简单的 PCR 引物设计和实验样品准备指引。如果您在完成所有步骤前停下实验，请将您的 PCR 或 酶切产物储存在 -20°C ，直到您重新开始进行下一步实验。**请避免反复冻融产物。**

我们建议初次使用的用户使用试剂盒提供的阳性对照试剂进行阳性对照 PCR。该 PCR 的产物能在解链和退火步骤以及错配酶切中作为对照。

1. 引物设计

- 1) 靶点 PCR 引物的 T_m 值应不低于 62°C 。
- 2) 为取得最佳效果，扩增产物的大小应为约 500~800 bp。
- 3) 设计引物时，应注意让 CRISPR sgRNA 或 TALEN 的剪切位点偏离 PCR 扩增产物的中心点约 100 bp。这能使的酶切产物的条带跑胶结果易于区分。

2. 样品准备

- 方法 1: 提取基因组 DNA
 - a) 收集细胞（不少于每孔 $\sim 10^6$ 个细胞）。
 - b) 按您选择的方法提取基因组 DNA，或依照提取试剂盒生产商提供的实验步骤进行。确保基因组 DNA 溶液浓度至少为 25 ng/ μL 。
- 方法 2: 裂解细胞
 - a) 收集细胞至离心管中，3000 rpm、 4°C 离心 5 min，小心去除上清的培养基。
 - b) 加入 300 μL 1 × PBS，用枪头轻轻吹打重悬细胞，3000 rpm、 4°C 离心 5 min，小心去除上清。
 - c) 加入 300 μL 1 × PBS，用枪头吹打再次悬浮细胞。（如需计数，则可在此步用 PBS 重悬细胞后取少量细胞悬液进行计数操作。）3000 rpm、 4°C 离心 5 min，尽可能地去除上清（关键）。沉淀所得细胞可直接进行裂解操作，或储存于 -80°C 。
 - d) 加入 25 μL Lysis Buffer，于 65°C 裂解细胞 15 min，随后于 95°C 灭活 10 min，然后迅速置于冰上。

注：Lysis Buffer 的具体用量可根据细胞数目进行调整。我们建议每 25 μL 的 Lysis Buffer 裂解 50,000 至 5×10^5 个细胞。如需裂解一个 96 孔板孔内的细胞，建议加入 50-100 μL Lysis buffer。如需裂解一个 6 孔板孔内的细胞，建议加入 200-600 μL Lysis Buffer。如您需要扩增 > 1 kb 的片段时，我们建议延长裂解时间至 40 min，但是不宜超过 1h。

但大多数实验其实并不需要裂解所有细胞。您可以取适量进行裂解，其余细胞去除上清后储存在 -80°C ，或是继续培养。

- e) 12000 rpm、4° C离心 1 min。

注: 如果离心后还出现大量絮状物, 说明裂解不完全。可以将上清转移至另一个离心管中, 往沉淀中继续加入 25 μ L Lysis Buffer进行裂解。

- f) 用靶点 PCR 试剂盒对细胞裂解产物进行PCR。细胞裂解产物可以在4° C下储存一周, 或在 -20° C下储存数月, 直至下一次使用。

3. 靶点PCR及产物处理

经过靶点PCR反应得到的特异性扩增产物, 后续需要通过克隆至平末端连接载体并送测序, 用于筛选带有目的的基因组编辑修饰, 因此需保证用于载体连接反应的PCR产物是平末端片段。

1) 靶点 PCR

a) 提前将2 \times SuperHero PCR Mix置于冰上解冻。对于提取的基因组 DNA, 请参考下表配制含有靶点特异 PCR 引物的 PCR 反应体系:

组分	用量
基因组DNA	50-200 ng
靶点 PCR 引物 (每段引物 5 μ M)	1.25 μ L
2 \times SuperHero PCR Mix	12.5 μ L
ddH ₂ O	to 25 μ L
总体积	25 μL

b) 对于细胞裂解物, 请参考下表配制含有靶点特异 PCR 引物的 PCR 反应体系:

组分	用量
细胞裂解物	1* μ L
靶点 PCR 引物 (每段引物 5 μ M)	1.25 μ L
2 \times SuperHero PCR Mix	12.5 μ L
ddH ₂ O	to 25 μ L
总体积	25 μL

*为避免 PCR扩增效率不足, 请依据细胞数调整加入的裂解物体积, 保证每反应体系至少含有 200 拷贝的模板。例如 HT1080 细胞系为二倍体, 则每个 PCR 反应体系就需要至少 1000 个裂解细胞; 如要在琼脂糖凝胶上获得清晰明亮的条带, 一般需要裂解约10,000 个细胞进行反应。

注: 对照 PCR 反应体系请见附录 3。

c) 使用以下程序进行 PCR:

94°C	5 min	1 cycle
94°C	30 s	} 35 cycs
58°C	30 s	
72°C	1 min	
72°C	5 min	1 cycle

注: PCR应产生足量且大小正确的单一条带。我们强烈建议您使用高保真的 DNA 聚合酶, 以减少 PCR 过程中引入的突变。特异的 PCR 扩增产物可不经胶回收而直接用作 T7 核酸内切酶 I 酶切的底物。

2) 如 PCR 反应产生非特异扩增条带, 可以使用胶回收纯化大小正确的 PCR 产物条带。请见附录 2 了解如何用胶回收纯化方法优化非特异性扩增产物的酶切结果。

4. 解链和退火

PCR产物含有野生型和突变型两种片段, 进行解链和退火, 可使带有不同靶序列的单链DNA相互错配, 一部分会形成异源双链DNA而被T7核酸内切酶I识别并切割。为了保证效果请在操作前保证PCR产物的条带单一。

1) 对于纯化的基因组DNA的PCR产物, 配制以下反应体系:

DNA (>25 ng/μL)	200~500 ng
10× T7EN Buffer	2 μL
无核酸酶ddH ₂ O	加至 19 μL
总体积	19 μL

如您使用的是GeneCopoeia提供的靶点PCR试剂, 可使用以下的反应体系:

未经纯化的 PCR 产物	200~500 ng (5~19 μL)
无核酸酶ddH ₂ O	加至 19 μL
Total	19 μL

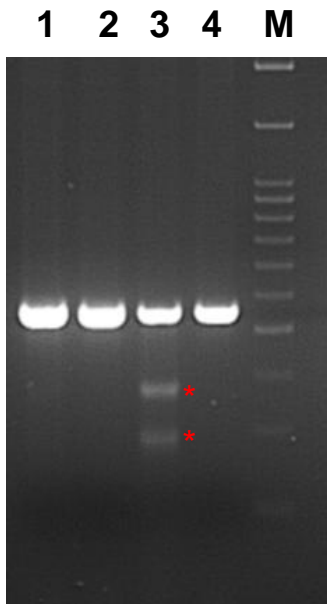
- 2) 将反应体系混合均匀, 高速离心数秒。
- 3) 在 95°C 加热 5 分钟。
- 4) 退火: 将解链后的 PCR 产物冷却至室温。

5. T7 核酸内切酶 I 酶切检测

- 1) 每反应体系加入 1 μL 浓度为 2 U/μL 的 T7 核酸内切酶 I。
- 2) 在 37°C 反应 20-60 分钟。

6. 凝胶电泳分析

- 1) 在每个酶切反应体系中加入 2 μL 的 10 \times loading buffer [with 0.1% SDS] 并混匀。
- 2) 将一半的反应体系混合物加到 2% agarose/EtBr 胶的孔中，在 TAE 或 TBE 缓冲液中进行电泳。
- 3) 注意电泳前需在紧邻样品泳道的孔中加入 100 bp DNA ladder (#M01010A) 一起跑胶，作为条带大小的参照。使用 5 V/cm – 11 V/cm 的条件进行电泳，直到溴酚蓝带迁移到凝胶长度的 2/3 处即可停止电泳。



目的基因	PCR 产物	T7 核酸内切酶 I 酶切产物	
NR0B1	429	147	282

图 3. T7 核酸内切酶 I 检测。

泳道 1: 阴性对照细胞的 PCR 扩增产物，T7 核酸内切酶 I 酶切。

泳道 2: 阴性对照细胞的 PCR 扩增产物，未经酶切。

泳道 3: 实验组细胞的 PCR 产物，T7 核酸内切酶 I 酶切。酶切跑胶结果可见 3 条条带，1 条与未被修饰的 PCR 扩增产物等长，2 条酶切产物条带长度如预期（红星标）。

泳道 4: 实验组细胞的 PCR 产物，未经酶切。

泳道 M: 100 bp plus DNA ladder (#M01010A)。

7. 测序验证（接步骤 3）

- 1) PCR 产物的连接：将连接体系置于 25°C 水浴锅中连接 1 h。若室温高于 25°C，则需置于 25°C 恒温环境中连接 1 h。

连接反应体系如下：

试剂	体积	终浓度/量
5 \times Ligase Buffer	2 μL	1 \times
T4 DNA Ligase (200 U/ μL)	1 μL	200 U
Blunt-end linear vector (20 ng/ μL)	1 μL	20 ng
靶点 PCR 产物	1 μL^*	$\geq 30 \text{ ng}^*$
ddH ₂ O	up to 10 μL^*	—
Total	10 μL	

注：*根据 PCR 产物的浓度进行加样，若琼脂糖凝胶电泳条带亮度不太明亮，则建议进行 PCR 产物定量（如 Qubit 定量等），适当提高目的片段的量，保证连接体系中目的片段最低量有 30 ng。

IndelCheck™ CRISPR/TALEN 插入缺失检测体系

- 2) 将准备好的DH5a感受态细胞置于冰上融化。
- 3) 按实验需要准备足够的离心管并置于冰上，各分装 100 μL 融化后的 DH5a感受态细胞。
- 4) 每管 100 μL DH5a 感受态细胞（建议转化效率为 1×10^9 ）加入2 μL 连接产物，冰上孵育30分钟；
- 5) 将装有感受态细胞的离心管置于42°C恒温条件下热激45秒，然后迅速置于冰上冰浴 3 分钟；
- 6) 每管加入400 μL SOC（或LB）培养基，37°C 220 rpm 摇床培养 1 小时；
- 7) 涂布 200 μL 培养液至氨苄抗性LB平板（建议抗生素浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），37°C 培养过夜；
- 8) 阳性检测：于每个平板上随机挑取数个（例如10个）菌落进行PCR验证，使用试剂盒中的 Forward sequencing primer (20 μM) / Reverse sequencing primer (20 μM) 检测阳性菌落，请参考您的PCR反应体系供应商提供的指引进行PCR反应。

例如：

试剂	体积	终浓度/量
2x PCR buffer	12.5 μL	1x
Forward sequencing primer (20 μM)	1 μL	0.8 μM
Reverse sequencing primer (20 μM)	1 μL	0.8 μM
dNTP (25 mM)	0.2 μL	0.2 mM
Enzyme (5 U/ μL)	0.2 μL	1U
菌落样本	1 μL	—
ddH ₂ O	9.1 μL	—
Total	25 μL	

PCR反应程序为：

温度	时间	循环数
94°C	5 min	1 cycle
94°C	30 s	30 cycs
58°C	30 s	
72°C	1 min*	
72°C	5 min	1 cycle

*根据片段长度调整延伸时间，普通Taq DNA聚合酶的延伸速率约为1000 bp/min。

9) 接种（检菌阳性）单菌落至4-5 mL 氨苄抗性LB培养基（抗生素建议浓度为100 μg/mL）中，37°C 220rpm 摇菌过夜；

10) 按照您的质粒提取供应商提供的指引提取质粒，使用Forward sequencing primer（20 μM）以及Reverse sequencing primer（20 μM）特异性引物进行测序验证。

8. Control Insert的连接（阳性克隆对照）

为确保实验的顺利进行，初次使用试剂盒时建议同时建立Control Insert（40 ng/μL）的连接实验，帮助实验结果的准确判断，Control Insert的连接实验反应体系如下所示：

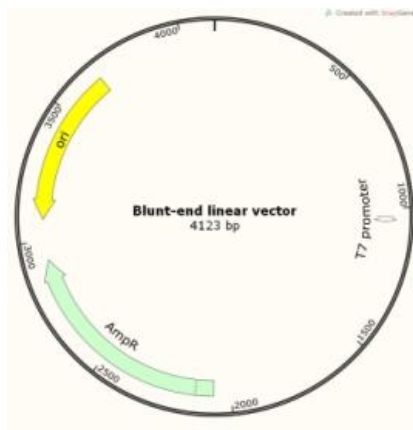
试剂	体积	终浓度/量
5× Ligase Buffer	2 μL	1×
T4 DNA Ligase	1 μL	200 U
Blunt-end linear vector	1 μL	20 ng
Control Insert	1 μL	40 ng
ddH ₂ O	5 μL	—
Total	10 μL	

将反应体系置于水浴锅中25°C连接1 h。若室温高于25°C，则需置于25°C恒温环境中连接1 h。取2 μL的连接反应产物于100 μL的DH5a（建议转化效率为1×10⁹）感受态细胞中，转化步骤及阳性率检测参考步骤7.2) -7.8)。

附：Blunt-end linear vector的部分载体序列及引物序列信息如下所示：



Blunt PCR product



Forward Sequencing Primer: 5'-agaagcacaagccctcgg-3'
 Reverse Sequencing Primer: 5'-gtctgataatggtccgttg-3'

VI. 疑难解析

酶切分析 疑难解析

问题	可能的原因	建议解决方法
切出非预期大小的条带	PCR 产物中含有非特异扩增条带	<ul style="list-style-type: none"> • 胶回收纯化 PCR 产物，确保您用于酶切的 PCR 扩增产物是条带单一的（见附录的图 4） • 优化 PCR 引物的设计 • 优化 PCR 反应条件
看不到预期的酶切产物条带	T7 核酸内切酶 I 活性太低	<ul style="list-style-type: none"> • 如果阳性对照也观察不到酶切产物条带，请在酶切反应体系添加 $MnCl_2$ 至终浓度为 10mM 来增加 T7 核酸内切酶 I 的活性。
酶切后出现弥散条带或底物被降解	不正确的酶切反应温度	<ul style="list-style-type: none"> • 请确保您的酶切体系是在 37°C.进行反应的。
	反应时间过长	<ul style="list-style-type: none"> • 避免酶切反应超过 1 个半小时。
	退火反应效果不佳	<ul style="list-style-type: none"> • 在热水浴中进行解链和退火。让反应体系随水浴一起自然降温。 • 在敏感度良好的 PCR 仪进行解链和退火，步骤如下： (1) 95°C 5min (2) 94°C(-2°C/cycle), 10-20 sec (3) 93°C(-2°C/cycle), 10-20sec 然后回到 step (2),34 cycles
酶切得到的 DNA 条带太弱，无法看清	PCR 引入点突变	<ul style="list-style-type: none"> • 确保在靶点 PCR 使用高保真的 DNA 聚合酶。
	基因组修饰的阳性率低	<ul style="list-style-type: none"> • 如果可能的话，请尽量优化您基因组编辑实验的条件（如设计新的 CRISPR sgRNA 或 TALEN）。
	上样的 DNA 量不足	<ul style="list-style-type: none"> • 保证 DNA 上样量在凝胶上可见。此外，确保每个泳道的 PCR 产物 DNA 上样量相等。

靶点 PCR 疑难解析

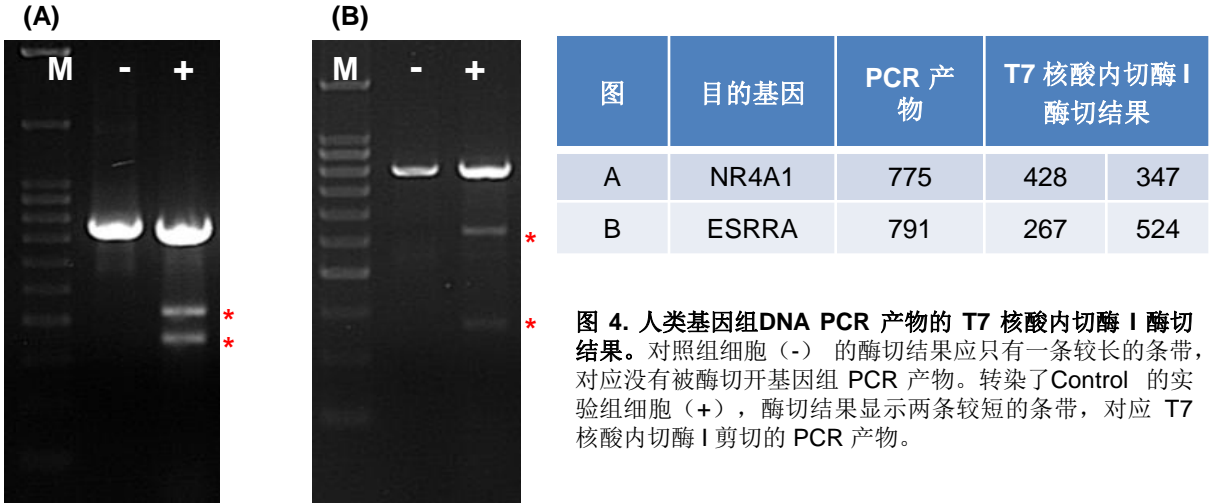
问题	可能的原因	建议解决方法
看不到预期条带	PCR 条件不佳	<ul style="list-style-type: none"> 分析您的靶点序列。如果 GC 值低于 40%，不要在 PCR 反应体系里加入 5×Enhancer。
	PCR 模板浓度太低	<ul style="list-style-type: none"> 提取并纯化基因组 DNA 来更好地控制模板浓度。
	裂解不完全	<ul style="list-style-type: none"> 在加入 Lysis Buffer 前尽可能除去 PBS，否则残留的 PBS 会稀释 Lysis Buffer。 在裂解细胞前，使用血球计数板或细胞计数器计算细胞数。根据细胞数目调整 Lysis Buffer 的体积。
	PCR 引物设计不佳	<ul style="list-style-type: none"> 检查引物是否正确匹配模板
非特异性扩增条带	PCR 条件不佳	<ul style="list-style-type: none"> 将退火温度提高到比 Tm 值高 0~5°C。
	PCR 引物设计不佳	<ul style="list-style-type: none"> 检查引物设计，看是否存在非特异结合。如有需要，重新设计引物以改善特异性。
	太多 DNA 聚合酶	<ul style="list-style-type: none"> 将 DNA 聚合酶的用量降低到 0.2 μL(1U)
拖尾	PCR 模板浓度太高	<ul style="list-style-type: none"> 稀释模板浓度至原来的 1/2 甚至更低，重做 PCR。
	太多 DNA 聚合酶	<ul style="list-style-type: none"> 将 DNA 聚合酶的用量降低到 0.2 μL(1U)

靶点 PCR 产物亚克隆疑难解析

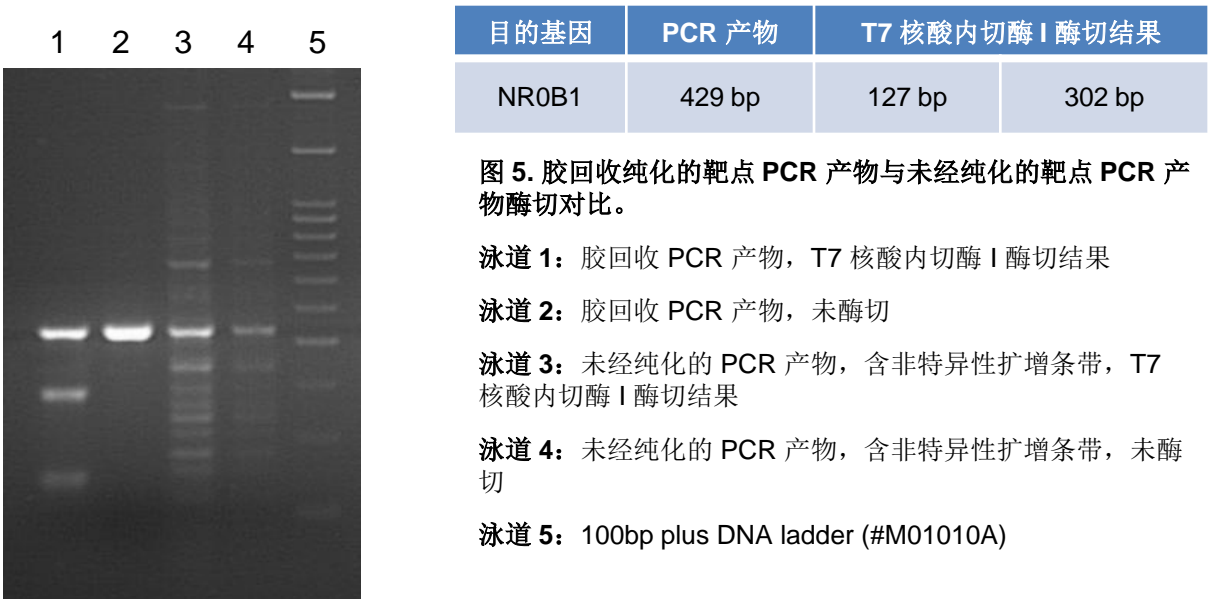
问题	可能的原因	建议解决方法
连接反应失败或效率太低，导致转化阴性或长菌少	连接酶失活	<ul style="list-style-type: none"> 使用试剂盒中的阳性对照片段，在进行连接反应时设置阳性对照组，以观察T4 DNA 连接酶活性是否正常。
	反应体系缺乏ATP或镁离子	<ul style="list-style-type: none"> 请使用试剂盒所配的 5× Ligase Buffer 进行实验。该试剂中已含有 ATP 和镁离子。如果你希望改变实验体系，请务必按照附录的实验流程设置阳性对照组方便进行疑难排查。
	反应体系的总 DNA 浓度过高	<ul style="list-style-type: none"> 体系中总 DNA 浓度过高会导致连接反应只生成线性化的大片段。请调整连接体系中的 PCR 产物片段到合适的浓度。 在进行连接反应时设置阳性对照组。试剂盒的阳性对照组反应体系是经过优化的，可作为实验反应体系优化的参考。
	PCR 产物非平端	<ul style="list-style-type: none"> 靶点PCR 克隆试剂盒使用的是平端载体。如果您的 PCR 体系产物都带有黏端突出，则无法与该载体匹配使用。 我们推荐您使用 IndelCheck系列的靶点 PCR 试剂盒。该试剂盒生成的 PCR 产物是平端及带有黏端突出的片段混合物，可以同时适用于平端载体及加了黏端突出的载体。
转化长菌过多	转化时存在污染	<ul style="list-style-type: none"> 请在转化时设置不加入连接产物的阴性对照组，方便排查这类污染问题。
	假阳性	<ul style="list-style-type: none"> 试剂盒的载体本身带有致死基因，能大大减少载体自连导致的转化假阳性现象。如果您使用的并非试剂盒的载体，请按照附录的实验流程设置阳性对照组以便进行疑难排查。
	连接反应效率高	<ul style="list-style-type: none"> 可考虑减少转化使用的连接体系的量，或通过减少 T4 DNA 连接酶用量、缩短连接反应时间等方式进行优化。优化时请同时设置对照组方便进行疑难排查。

VII. 附录

1. 使用 IndelCheck™ 检测体系验证 CRISPR sgRNA 或 TALEN 的剪切活性

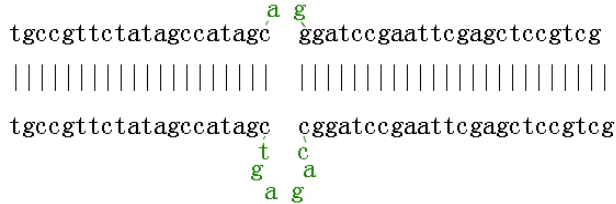


2. 用胶回收纯化方法优化非特异性扩增产物的酶切结果



3. 使用 control template & primer mix 进行阳性对照靶点 PCR 及 T7 核酸内切酶 I 检测的实验步骤:

本试剂盒提供靶点 PCR 和错配酶切的正对照。正对照由control template及包含正反向引物的primer mix组成，经过PCR扩增后会产生含有两种不同序列的双链DNA片段。经过变性和退火后，有一定几率会产生含以下结构的异源双链DNA，从而被T7核酸内切酶I识别并切割。



1) 对照 PCR

a) 请参考下表准备对照 PCR 体系。

组分	用量
Control template & primer mix	4 μL
2 × SuperHero PCR Mix	12.5 μL
ddH ₂ O	8.5 μL
总体积	25 μL

b) 使用以下程序进行 PCR:

94°C	5 min	1 cycle
94°C	30 s	} 35 cycs
58°C	30 s	
72°C	1 min	
72°C	5 min	1 cycle

2) 解链和退火

a) 使用 GeneCopoeia 靶点 PCR 试剂盒扩增所得的产物请使用如下体系:

未经纯化的 PCR 产物	200~500 ng (5~19μL)
无核酸酶水	加至 19 μL
Total	19 μL

- b) 混合并高速离心数秒。
- c) 95°C 加热 5 分钟。
- d) 退火：将解链后的 PCR 产物冷却至室温。

3) T7 核酸内切酶 I 消化

- a) 加入 1μL 浓度为 2U/μL 的 T7 核酸内切酶 I。
- b) 在 37°C 反应 20-60 分钟。

4) 凝胶电泳分析

- a) 在每个酶切反应体系中加入 2 μL 10 × loading buffer [with 0.1% SDS] 并混匀。
- b) 将一半的反应体系混合物加到 2% agarose/EtBr 胶的孔中，在 TAE 或 TBE 缓冲液中进行电泳。
- c) 注意电泳前需在紧邻样品泳道的孔中加入 100bp DNA ladder (#M01010A) 一起跑胶，作为条带大小的参照。使用 5 V/cm 的条件进行电泳，直到溴酚蓝带迁移到凝胶长度的 2/3 处即可停止电泳。

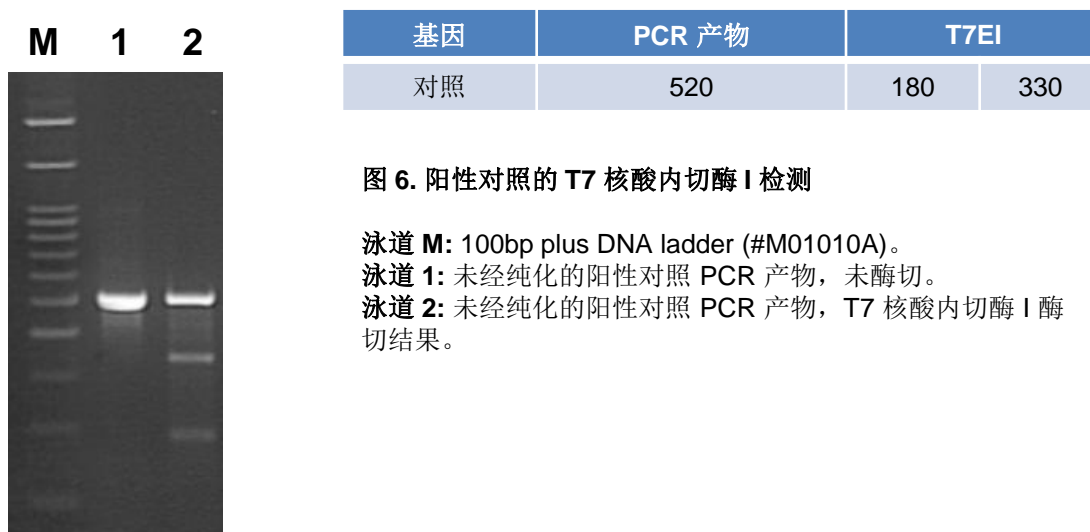


图 6. 阳性对照的 T7 核酸内切酶 I 检测

泳道 M: 100bp plus DNA ladder (#M01010A)。

泳道 1: 未经纯化的阳性对照 PCR 产物，未酶切。

泳道 2: 未经纯化的阳性对照 PCR 产物，T7 核酸内切酶 I 酶切结果。

4. 使用靶点 PCR 克隆试剂盒的 Control insert 进行阳性对照克隆

请直接参考前文 IV. 8 的操作说明

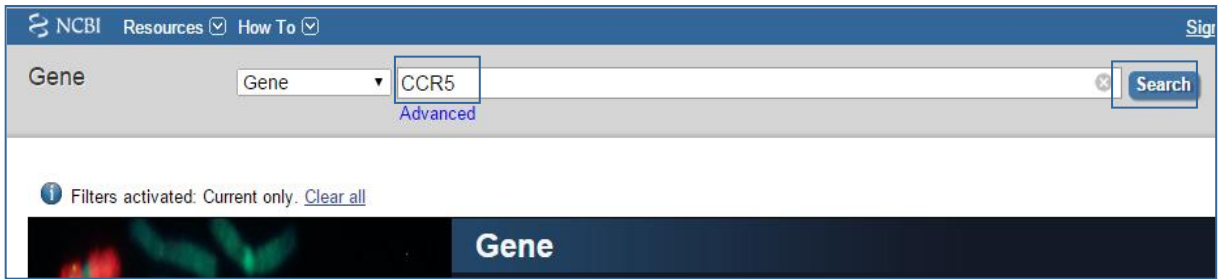
4. 使用在线工具搜索潜在的SNP 位点

哺乳动物细胞一般是每个染色体都至少有两个拷贝，一个拷贝来自母亲，另一个来自父亲。两个拷贝的大部分序列都是一致的，但也有可能在某些位点存在 **SNP** 或者碱基差异等现象。此外，有些癌基因如 **P53** 常常会含有大量的突变。因此即使是在阴性对照，样本在经过解链和退火后也有可能产生 **T7** 核酸内切酶 I 可以切割的错配。这就是为什么我们要在设计靶点 **PCR** 引物时避开潜在的 **SNP** 位点。

我们强烈建议您在设计引物及进行任何实验前先获取您所使用的细胞系基因组靶点序列信息。NCBI 提供搜索基因潜在 **SNP** 位点信息的[教程](#)。我们在此提供一个简要的步骤说明。

●用基因名搜索

1. 在 [Gene](#) 数据库使用基因名进行搜索。如您已知基因符号和物种，请按以下方式输入：
tpo[sym] AND human[orgn]。



2. 点击搜索目的基因。

Results: 1 to 20 of 411

Filters activated: Current only. [Clear all](#) to show 417 items.

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases	MIM
<input type="checkbox"/> CCR5 ID: 1234	chemokine (C-C motif) receptor 5 (gene/pseudogene) [<i>Homo sapiens</i> (human)]	Chromosome 3, NC_000003.12 (46370142..46376206)	CC-CKR-5, CCCKR5, CCR-5, CD195, CKR-5, CKR5, CMKBR5, IDDM22	601

3. 点击右侧 **Links** 栏目的 "GeneView in dbSNP"。如页面没有出现此链接，说明该基因目前还没有已知的 **SNP** 位点。
4. 如您搜索的是人类基因，可以翻到点击右上方目录里的 **Variation**，然后进一步链接到 [Variation Viewer](#) 去查看 GRCh37/hg19 或 GRCh39/h38 序列拼接集，查看 [1000 Genomes Browser](#)，[ClinVar](#) 和其他更多选项。

CCR5 chemokine (C-C motif) receptor 5 (gene/pseudogene) [*Homo sapiens* (human)]

Gene ID: 1234, updated on 17-May-2015

Summary

Official Symbol CCR5 provided by [HGNC](#)

Official Full Name chemokine (C-C motif) receptor 5 (gene/pseudogene) provided by [HGNC](#)

Primary source [HGNC:HGNC:1606](#)

See related [HPRD:03223](#); [MIM:601373](#)

Gene type protein coding

RefSeq status REVIEWED

Organism [Homo sapiens](#)

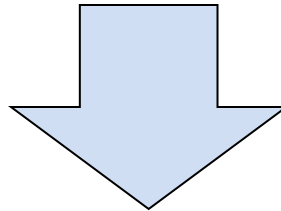
Lineage Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo

Also known as CKR5; CCR-5; CD195; CKR-5; CCCKR5; CMKBR5; IDDM22; CC-CKR-5

Summary This gene encodes a member of the beta chemokine receptor family, which is predicted to be a seven transmembrane protein similar to G protein-coupled receptors. This protein is expressed

Table of contents

- Summary
- Genomic context
- Genomic regions, transcripts, and products
- Bibliography
- Phenotypes
- Variation**
- HIV-1 interactions
- Pathways from BioSystems
- Interactions
- General gene information
 - Markers, Clone Names, Homology, Gene Ontology
- General protein information
- NCBI Reference Sequences (RefSeq)



Variation

[See variants in ClinVar](#)

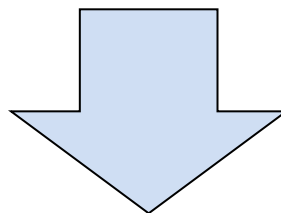
[See studies and variants in dbVar](#)

[See Variation Viewer \(GRCh37.p13\)](#)

Genotypes

[See SNP Geneview Report](#)

[See 1000 Genomes Browser \(GRCh37.p13\)](#)



SNP linked to Gene (geneID:1234) Via Contig Annotation

The SNP GeneView page only reports human variation on GRCh38. A new [Variation Viewer](#) is available to view the gene CCR5 variations in [GRCh37p13](#) or [GRCh38](#), and will replace SNP GeneView later this year. Please visit the [Help Page](#) or [YouTube](#) for available features and send your comments and suggestions to NCBI [helpdesk](#).

Send rs# on all gene models to Batch Query all rs# to file.

Gene Model (mRNA alignment) information from genome sequence ↑

Total gene model (contig mRNA transcript): 2

mrna	transcript	protein	mrna orientation	Contig	Contig Label	List SNP
NM_000579.3	plus strand	NP_000570.1	forward	NT_022517.19	GRCh38.p2	<- currently shown
NM_001100168.1	plus strand	NP_001093638.1	forward	NT_022517.19	GRCh38.p2	View snp on GeneModel

Clinical Source in gene region cSNP has frequency double hit

gene model	Contig Label	Contig	mrna	protein	mrna orientation	transcript	snp count
(contig mRNA transcript):	GRCh38.p2	NT_022517.19	NM_000579.3	NP_000570.1	forward	plus strand	259, coding

Region	Chr. position	mRNA pos	dbSNP rs# cluster id	Heterozygosity	Validation	MAF	Allele origin	3D	Linkout	Function	dbSNP allele	Protein residue	Codon pos	Amino acid pos	PubMed
	46372912	367	rs748244565	N.D.						missense	G	Glu [E]	1	4	
										contig reference	C	Gln [Q]	1	4	
	46372913	368	rs745912425	0.000						frame shift	-	Arg [R]	2	4	
										contig reference	AA	Gln [Q]	2	4	
	46372915	370	rs763192695	0.000						missense	A	Met [M]	1	5	
										contig reference	G	Val [V]	1	5	
	46372916	371	rs766432600	0.000						missense	G	Gly [G]	2	5	
										contig reference	T	Val [V]	2	5	
	46372934	389	rs751603911	0.000						missense	G	Gly [G]	2	11	
										contig reference	A	Asp [D]	2	11	
	46372936	391	rs755442066	0.000						missense	G	Val [V]	1	12	
										contig reference	A	Ile [I]	1	12	
	46372937	392	rs781613165	0.000						missense	C	Thr [T]	2	12	
										contig reference	T	Ile [I]	2	12	
	46372939	394	rs753095965	0.000						missense	G	Asp [D]	1	13	

图7. NCBI 的 SNP Geneview Report 页面示例。在“mRNA pos”栏查阅您的靶点是否落在潜在的 SNP 位点上。您也可以通过“Chr. position”或者“db SNP rs# cluster id”栏目查阅相关位点的序列，与您的测序结果进行对比。

VIII. 使用许可及质保声明

有限使用许可

Following terms and conditions apply to use of the IndelCheck™ CRISPR/TALEN insertion or deletion detection system. If the terms and conditions are not acceptable, the Product in its entirety must be returned to GeneCopoeia within 5 calendar days. A limited End-User license is granted to the purchaser of the Product. The Product shall be used by the purchaser for internal research purposes only. The Product is expressly not designed, intended, or warranted for use in humans or for therapeutic or diagnostic use. The Product must not be resold, repackaged or modified for resale, or used to manufacture commercial products or deliver information obtained in service without prior written consent from GeneCopoeia. Use of any part of the Product constitutes acceptance of the above terms.

有限质量保证

GeneCopoeia warrants that the Product meets the specifications described in the accompanying Product Datasheet. If it is proven to the satisfaction of GeneCopoeia that the Product fails to meet these specifications, GeneCopoeia will replace the Product. In the event a replacement cannot be provided, GeneCopoeia will provide the purchaser with a refund. This limited warranty shall not extend to anyone other than the original purchaser of the Product. Notice of nonconforming products must be made to GeneCopoeia within 30 days of receipt of the Product. GeneCopoeia's liability is expressly limited to replacement of Product or a refund limited to the actual purchase price. GeneCopoeia's liability does not extend to any damages arising from use or improper use of the Product, or losses associated with the use of additional materials or reagents. This limited warranty is the sole and exclusive warranty. GeneCopoeia does not provide any other warranties of any kind, expressed or implied, including the merchantability or fitness of the Product for a particular purpose.

GeneCopoeia is committed to providing our customers with high-quality products. If you should have any questions or concerns about any GeneCopoeia products, please contact us at 301-762-0888.

© 2018 GeneCopoeia, Inc.

GeneCopoeia, Inc.
9620 Medical Center Drive
Rockville, MD 20850
Tel: 301-762-0888 Fax: 301-762-3888
Email: inquiry@genecopoeia.com
Web: www.genecopoeia.com

广州易锦生物技术有限公司
广州高新技术产业开发区广州科学城掬泉路3号
广州国际企业孵化器F区8楼
邮编: 510663
电话: 4006-020-200
邮箱: sales@igenebio.com
网址: www.genecopoeia.com (英文) www.igenebio.com (中文)