

商品名: T7EI Genome Editing Detection Kit

商品コード: DS710 50 rxn 本品は研究用です

キットの内容:

コンポーネント	容量	保存温度
①Lysis Buffer	2 Tubes	-20°C
②100× Dilution Buffer	1 Tube	-20°C
③2× PCR Mix	1 Tube	-20°C
④PCR control template & Primer	1 Tube	-20°C
⑤10× T7 Endonuclease I	1 Tube	-20°C
⑥10× Digestion Buffer	1 Tube	-20°C

保存条件:

-20°Cで保管してください。

※2× PCR Mix は 20 回の凍結融解において活性に大幅な低下が起こらないことを確認しています。
20 回以上凍結融解する可能性がある場合は小分け保管してください。

使用期限:

12 ヶ月

製品説明:

T7EI Genome Editing Detection Kit は、ゲノム DNA の編集効率を検出するキットです。ゲノム編集技術によって編集された遺伝子は付属のバッファーによって抽出・保存が可能で、希釈を行うだけで PCR に用いることができます。PCR 産物を再アニール後、切断酵素によってミスマッチを切断・電気泳動を行い、切断量を比較することでゲノム編集効率確認が可能です。

本製品以外に必要な試薬、器具、機器等:

- ・Nuclease free water (DR120 等)
- ・ヒートブロック
- ・試薬を秤量するピペッター、マイクロピペット等
- ・テストチューブ、遠沈管、マイクロプレート等
- ・PCR 装置
- ・電気泳動関連試薬、装置（アガロースゲル、ローディング Dye、電気泳動装置、DNA 検出色素、検出装置等）

Primer 設計:

実験の前に target を特異的に増幅可能な Primer ペアを設計する必要があります。なるべく下記条件に近くなるように設計し、事前にゲノム未編集細胞ライセートにおける PCR 条件検討を推奨します。

- $T_m = \geq 55^{\circ}\text{C}$
- Primer ペアの T_m の差が 1°C 以下
- Primer 鎖長が 18 – 22 bp
- GC content = 45 – 60%.
- PCR 産物が 400 – 500 bp
- Amplicon の T7 Endonuclease I による切断産物が異なる鎖長(鎖長差 >100 bp 推奨)になるようにデザインすることをお勧めします。

細胞の溶解・DNA の保存:

1. 1×10^6 個の細胞ペレットあたり 50 μL の Lysis Buffer を添加し、ピペティング等で混合します。
2. そのまま室温保管します(6 ヶ月 PCR に影響を与えないことを確認しています。6 か月以上長期の場合は凍結保管してください。)

PCR 増幅:

1. 細胞溶解液を 95°C で 5 min 加熱します。
2. 室温に放冷します(加熱後も保管可能です)。
3. 細胞溶解液を適量分取し、 $1 \times$ Dilution Buffer で 20 倍希釈します。
 ※ $100 \times$ Dilution Buffer は Nuclease free water で 100 倍希釈してください
 ※粘性が高いため、ピペット操作のロスに注意し、なるべく大きいスケールで調製してください
4. PCR 用テストチューブに下記の分量で PCR 溶液を作成します。

	Sample	Control
Water	22 μL	23 μL
Diluted Cell Lysate	1 μL	–
10 μM Forward Primer	1 μL	–
10 μM Reverse Primer	1 μL	–
Control Template & Primers	–	2 μL
$2 \times$ PCR Mix	25 μL	25 μL
Total	50 μL	50 μL

5. 下記の条件で PCR を実施します。

Stage	Temp	Time	Cycles
Activation	95°C	10 min	1 ×
Denature	95°C	30 sec	40 ×
Anneal	adjust * ¹	30 sec	
Extend	72°C	30 sec	
Final extention	72°C	7 min	1 ×
Hold	4°C	Hold	1 ×

*1 設計した Primer に合わせて設定してください。Control Template & Primers は 42-67°C に設定してください。

6. アガロースゲル電気泳動で target の増幅を確認します。

※バンド強度を定量しておくことで切断試験時の Input 量を調整しやすくなります

※Control Template & Primers はロード量 2 µL を中心に、バンド強度を調節してください。

切断試験:

1. 下記の分量でアニーリング溶液を作成します。

	Sample Amplicon	Control Template & Primers Amplicon	
	Sample * ¹	Positive Control	Negative Control
PCR Product * ²	1-8 µL	1-8 µL	1-8 µL
10 × Digestion Buffer	1 µL	1 µL	1 µL
Water	0-7 µL	0-7 µL	0-7 µL
Total	9 µL	9 µL	9 µL

*1 サンプルのコントロール (T7EI +/-) は必要に応じて調製してください

*2 サンプルの Amplicon 量は PCR 増幅手順 6 で調整した Control Template & Primers のバンド強度に合わせると比較しやすくなります。

2. 下記の条件でアニーリングを実施します。

Stage	Temp	Time
1	95°C	5 min
2	95-85°C	-2°C/sec
3	85-25°C	-0.1°C/sec
4	4°C	Hold

3. 下記の条件で 1 μ L の 10 $\times$ T7 Endonuclease I、または Nuclease free Water を添加します。

	Sample Amplicon	Control Template & Primers Amplicon	
	Sample	Positive Control	Negative Control
10 $\times$ T7 Endonuclease I	1 μ L	1 μ L	–
Nuclease free water	–	–	1 μ L

4. 30℃で 15 min インキュベートし、反応後、オーバーリアクションを防ぐため 4℃に冷却します。

5. アガロースゲル電気泳動で全量泳動し、target の切断を確認します。

(直ちに電気泳動を行わない場合は 1 μ L の 100 μ M EDTA を添加して、凍結保管してください)

実施例:

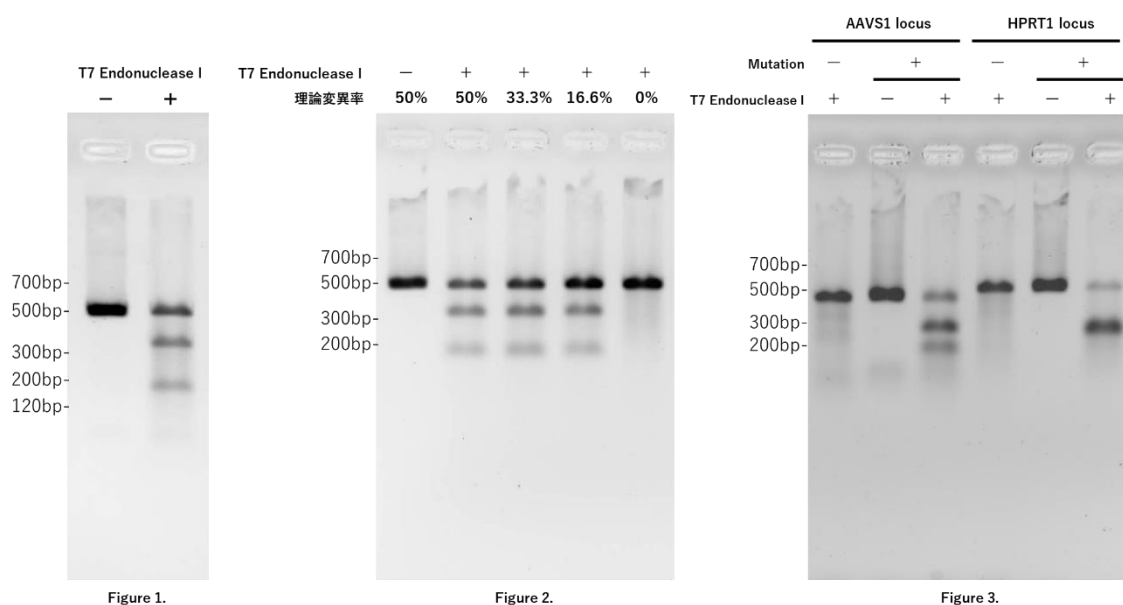


Figure 1. 付属の Control Template & Primers の Amplicon を T7EI を用いて切断した。

Figure 2. 未変異 DNA 断片と変異 DNA 断片を混合・再アニールし、T7EI を用いて切断した。

Figure 3. AAVS1 locus と HPRT1 locus のそれぞれに対して、Crispr-Cas9 を用いて変異導入を行った。その後、変異導入部位の Amplicon を T7EI を用いて切断した。

トラブルシューティング:

問題	想定される原因	提案
PCR 産物がスミア	Lysate が高濃度 Primer 濃度が不適當 Primer デザインが不適當	Lysate を希釈してください Primer 濃度を検討してください Primer デザインを再検討してください PCR 条件を検討してください PCR 産物から target amplicon を精製してください Nested PCR を別途検討してください
PCR 産物が少ない 増幅が起こらない	Lysate が低濃度 Primer 濃度が不適當 Primer デザインが不適當	Lysate 量を増してください 抽出試薬あたりの細胞量を増やしてください Primer 濃度を検討してください Primer デザインを再検討してください PCR 条件を検討してください
切断が起こらない	酵素が target 配列にアクセスしにくい、できない	反応温度を 35°C に変更してください 反応時間を延ばしてください ゲノム編集部位を再検討してください
	ゲノム編集効率が悪い	トランスフェクションプロトコルを再確認してください
非特異的切断 過剰切断	非特異的な PCR 増幅	Primer デザインを再検討してください PCR 産物から target amplicon を精製してください
	酵素活性が過剰	反応温度を 25°C に変更してください
	特定の標的遺伝子座に対する検出酵素による非特異的切断	ゲノム未編集の細胞ライセートをネガティブコントロールとして使用し、バックグラウンドとして差し引いてください
解析が困難	非特異的な PCR 増幅	特異的な増幅が可能な Primer デザインを再検討してください PCR 産物から target amplicon を精製してください Control の非切断バンド強度を差し引いてください