

GK102操作指南

一、产品信息

Genomic DNA Extraction Kit for CRISPR Screen (GK102) 是一款专门用于 CRISPR 筛选实验的基因组提取试剂盒，适用于各种常见细胞和组织样本。本试剂盒采用高效特异的 DNA 结合吸附柱，可快速提取 CRISPR 筛选后细胞或组织等样本基因组 DNA。

二、产品组分

试剂盒包含常温和低温储存组分（图 1），内含组分依次为 Magic™ Buffer A、Buffer B、Washing Buffer A、Washing Buffer B、Buffer EB、RNase A、Proteinase K（图 2），以及配套吸附柱及收集管。



图 1. 试剂盒外包装



图 2. 试剂盒组分

表 1. 试剂盒产品组成

产品组成	50 次	存储条件
Magic™ Buffer A	20 mL	RT
Magic™ Buffer B	20 mL	RT
Magic™ Washing Buffer A	13 mL	RT
Magic™ Washing Buffer B	20 mL	RT
Magic™ Buffer EB	20 mL	RT
Magic™ Columns	50	RT
Magic™ Collection Tubes	50	RT
Magic™ Proteinase K	1 mL	-20°C
Magic™ RNase A	0.5 mL	-20°C

三、实验准备

Washing Buffer A 和 Washing Buffer B 使用前，须按瓶上标签所示，加入对应量的无水乙醇，混匀后方可使用。用前请检查 Buffer A、Buffer B 及 Washing Buffer A 中是否有沉淀析出，若有，可在 37°C 水浴中重新溶解，混匀后方可使用。自备试剂：磷酸缓冲液（PBS）、无水乙醇。

四、操作步骤

下面我们以细胞样本为例，为大家展示试剂盒的具体使用方法及注意事项。

首先，文库细胞筛选实验完成后，对细胞团样本进行收集。通常，为了保证文库的覆盖度和均一性，单个样本收集的细胞数量为 500×（即文库 sgRNA 数量×500）。如果文库较大（sgRNA 数量在 2 万以上），可降低至 300×。另外，若处理组由于筛选压力较大，细胞存活数量较少，可忽略乘数，按实际情况收样即可。为了实验数据可靠性，每组样本需 3-5 个重复。以 MDA-MB-231 细胞为例，用 1.5 mL 离心管收集不同数量细胞团如图所示（图 3）。

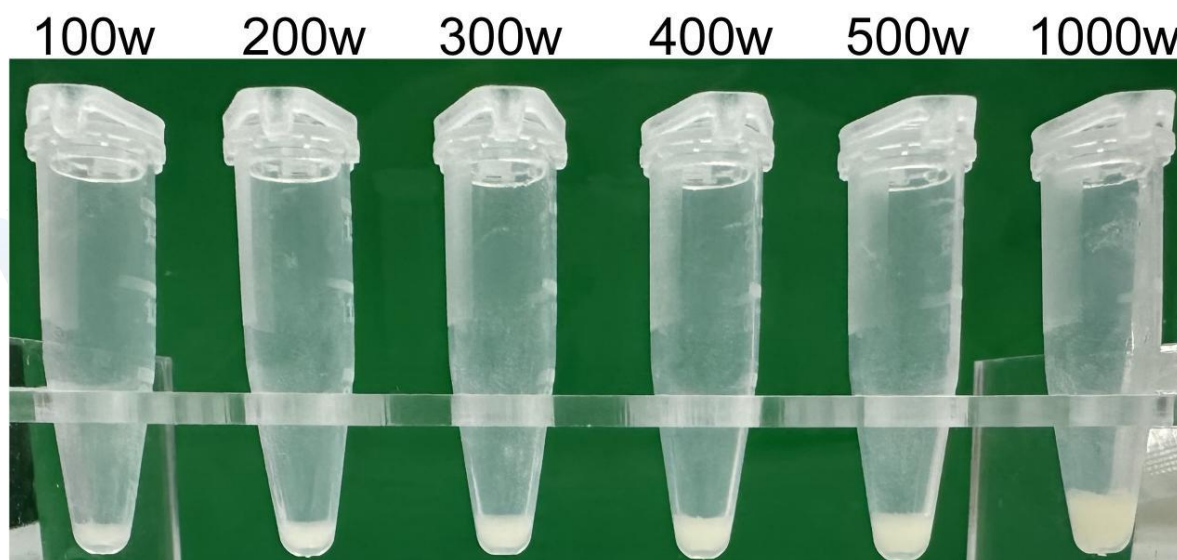


图 3 不同数量细胞团样本展示

细胞消化裂解

(1) 细胞总量不可超过 5×10^6 个。400 g 离心 5 min 收集细胞，弃上清液。加入 220 μ L PBS、10 μ L RNase A 和 20 μ L Proteinase K 至样品中，重悬细胞。室温静置 15 min 以上。注：1000w 细胞需分两个 EP 管。

(2) 加入 250 μ L Buffer B 至细胞悬液中，涡旋混匀，65°C 水浴 15-30 min。

(3) 加入 180 μ L 无水乙醇至消化液中，涡旋混匀 15-20 s。注：加入乙醇时可能会有沉淀形成，请用移液器吹打混匀沉淀后再过柱。

加入 PBS、
RNase A、
Proteinase K

加入 Buffer B

加入无水乙醇

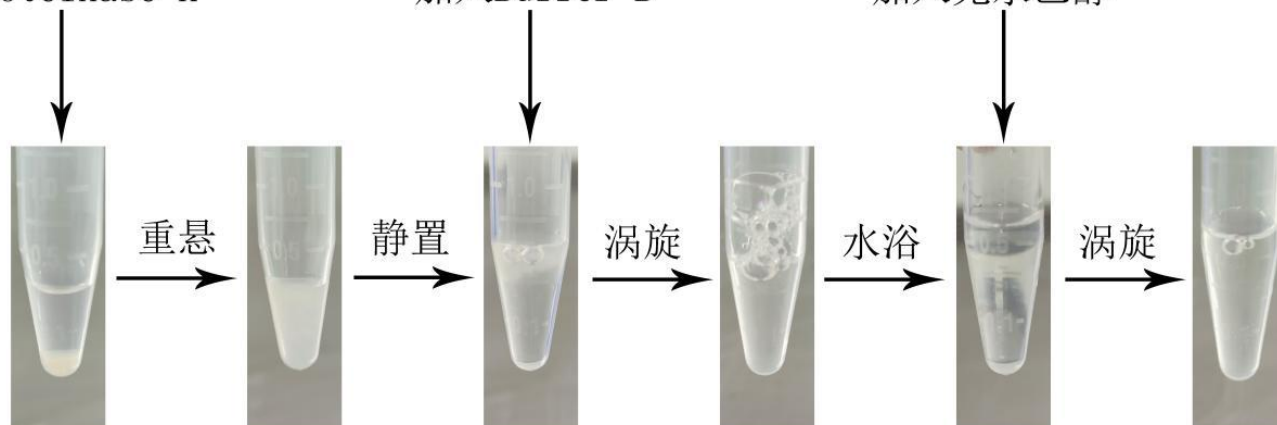


图 4 细胞团消化裂解过程图

过柱纯化

- (1) 将 Columns 吸附柱置于 Collection Tubes 收集管中。将上一步所得混合液（包括沉淀）转移至吸附柱中，13,000 g 离心 1 min。注：若出现堵柱现象，以最高转速离心 3-5 min。若混合液超过 750 μ L 需分次过柱。
- (2) 弃滤液，将吸附柱置于收集管中。加入 500 μ L Washing Buffer A 至吸附柱中，13,000 g 离心 1 min。
- (3) 弃滤液，将吸附柱置于收集管中。加入 650 μ L Washing Buffer B 至吸附柱中。13,000 g 离心 1 min。
- (4) 重复步骤 3。
- (5) 弃滤液，将吸附柱置于收集管中，13,000 g 离心 2 min。
- (6) 将吸附柱置于新的 1.5 mL 离心管，开盖晾干 5 min 使乙醇挥发。加入 30-100 μ L 70°C 预热的 Buffer EB 至吸附柱的膜中央，室温放置 3 min 后，13,000 g 离心 1 min。注：可将洗脱液重新加入吸附柱中洗脱一次，以增加基因组 DNA 的产量。
- (7) 弃掉吸附柱，将DNA保存于2~8°C，或于-20°C长期保存。