



CRISPR/Cas12a DNA检测试剂盒(二步法) (液体)(恒温-荧光型)

CRISPR-Cas12a DNA fluorescent detection kit
(2-step) (liquid)

✉ info@ezassay.com

🌐 www.ezassay.com

深圳易致生物科技有限公司

目录编号: D-F-CAS12-2S

目录 CONTENTS

内容	页码
产品简介	1
试剂盒组成	1
需要但未提供的材料	1
储存	2
检测样品	2
检测步骤	2
注意事项	4

产品简介

Brief introduction

Cas12a与crRNA形成功能复合物，在目标核酸序列上“滑行”，成功配对后，Cas12a被特异性激活，反式切割周围的报告分子（reporter）。本试剂盒将恒温扩增技术与Cas12a相结合，具有高灵敏度，高特异性，高信噪比等特点。已广泛用于分子诊断领域，可以实现对病原体的快速精准检测。

试剂盒组成

Materials supplied

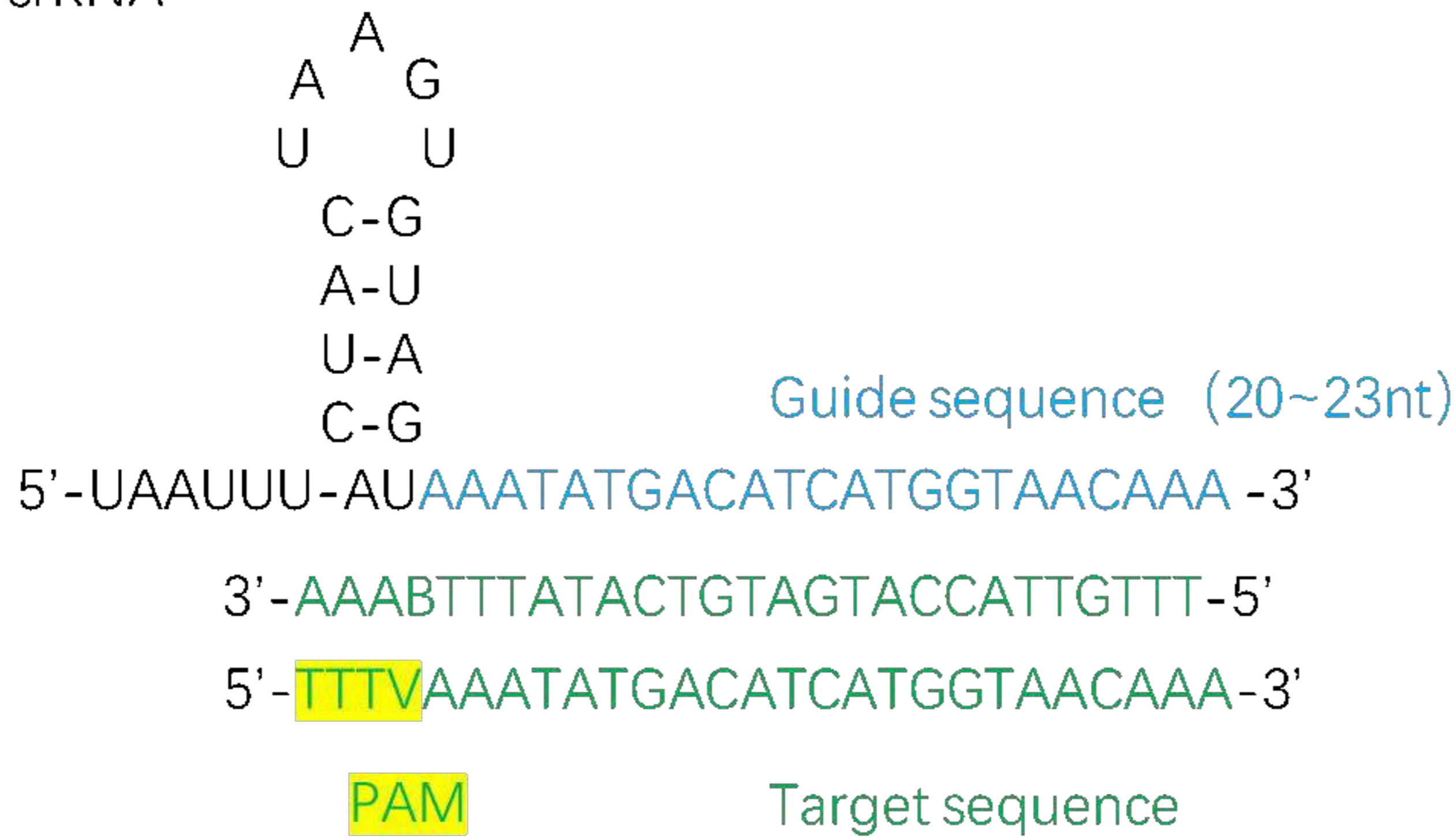
序号	Item	size
1	Reaction Buffer (2X)	1000 μ l
2	P-mix (10X)	200 μ l
3	E-mix (10X)	200 μ l
4	Positive Control (10X) (primer and DNA template included)	30 μ l
5	Cleavage Buffer (10X)	240 μ l
6	Cas12a Protein (10 μ M)	20 μ l
7	crRNA for Positive Control (20X)	20 μ l
8	Reporter (4 μ M)	80 μ l
9	Starter (10X)	200 μ l

需要但未提供的材料

Other materials required

1. 荧光仪，读FAM信号（例如qPCR仪）
2. 移液器
3. Nuclease-free water
4. 目标序列特异性引物（恒温扩增用）（在线设计：<https://ezassay.com/primer>）
5. crRNA/gRNA：与LbaCas12a结合，形成功能复合物，被目标序列特异性激活。
(LbaCas12a crRNA scaffold sequence结构序列: 5' - UAAUUUCUACUAAGUGUAGAU-3')

LbaCas12a crRNA



B for G/T/C
V for G/A/C

储存

Storage

-20°C保存，▲避免反复冻融。建议根据实际使用量分装保存。

检测样品

Sample for detection

DNA 模板（RNA模板需要反转录为cDNA）

本试剂盒最低检测下限为10~100copies/测试（依据引物筛选优化程度和检测手段）

检测步骤

Assay procedure

- 在冰上融化后混匀试剂。
- 恒温扩增反应，以配制20 μl反应体系为例（注意：冰上操作）

序号	名称	体积
01	Reaction Buffer (2X)	10 μ l
02	P-mix (10X)	2 μ l
03	E-mix (10X)	2 μ l
04	Forward Primer (20 μ M) Reverse Primer (20 μ M)	0.5 μ l 0.5 μ l
05	DNA template*	x μ l
06	Starter (10X) **	2 μ l
07	Nuclease-free H2O	To a total volume of 20 μ l

*无模板对照组用Nuclease-free H2O替代DNA template;
阳性对照组加入2 μ L Positive Control (primer and DNA template included)。
如模板浓度高推荐模板加样量为1 μ L, $x \leq 5 \mu$ L

**最后加入Starter混匀。

- 轻弹数次混匀，稍微离心（避免涡旋剧烈震荡），重复3次
- 37~ 42 $^{\circ}$ C 孵育20~40分钟
- 使用Cas12a检测特异性目标序列，提前打开荧光PCR仪并把反应温度设置为37 $^{\circ}$ C，关闭热盖功能或把热盖设置为45 $^{\circ}$ C。

以配制20 μ l反应体系为例，(如果荧光仪从顶部读荧光信号，建议配制大体积，例如40 μ l) (注意：冰上操作)：

序号	名称	体积
01	Cleavage Buffer (10X)	2 μ l
02	Reporter (4 μ M)	0.6 μ l
03	Cas12a Protein (1 μ M) *	1 μ l
04	crRNA (Cas12a) (1 μ M) **	1 μ l
05	扩增产物 ***	x μ l
06	Nuclease-free H2O	To a total volume of 20 μ l

* Cas12a Protein (10 μ M) 用Tris Buffer或ddH₂O稀释为Cas12a Protein (1 μ M)

**阳性对照组把“crRNA for Positive Control (20X)”加入1 μ l, 其他反应加入目标序列的特异性crRNA

***加入步骤2的恒温扩增产物, 如模板浓度高推荐模板加样量为1 μ L, $x \leq 5\mu$ L

- 轻弹数次混匀, 稍微离心 (避免涡旋剧烈震荡), 重复3次
- 将反应管放置于荧光PCR仪 (FAM通道), 37 °C条件下反应30 ~ 60 min。

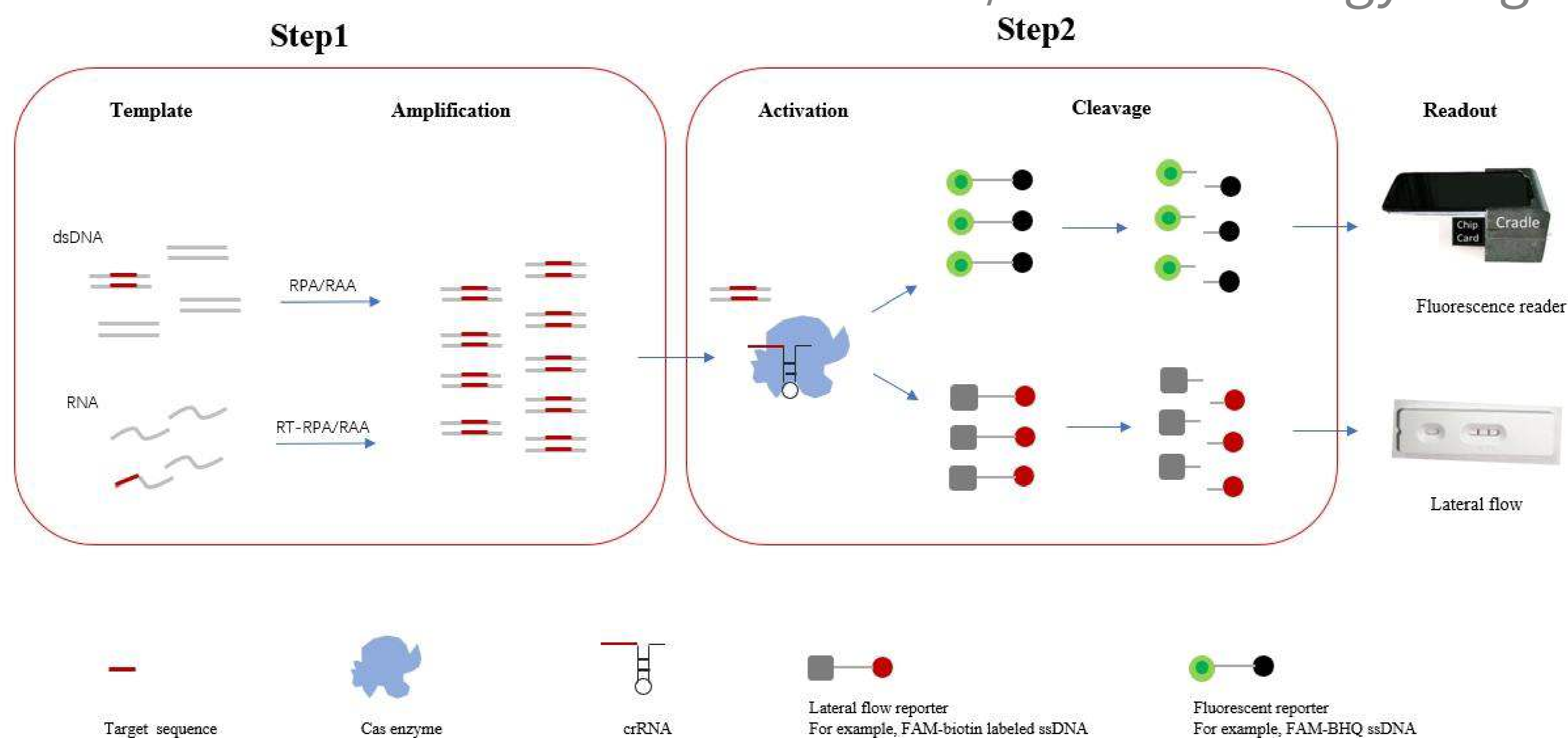
注意事项

Notes

- 如果使用PCR仪器, 请提前关闭热盖功能把热盖设置为45°C。
- 如果使用ABI 荧光仪, 将“Passive reference” & “Quencher” 设置为“None”。
- 试剂盒灵敏度非常高, 请注意避免扩增产物 (amplicons) 对下次试验的污染。(avoid carry-over contamination)
- 反应体系表格中的浓度为一般使用浓度, 不同的试验中最佳浓度可能不一样, 需要具体优化, 在此基础上增加或降低浓度。优化范围: 引物浓度 (每条终浓度300nM~800nM)、crRNA (20nM~1000nM)、reporter (20nM~1000nM)、Cas蛋白 (20nM~200nM)。

基于CRISPR/Cas技术的核酸检测技术示意图

Nucleic acid detection based on CRISPR/Cas technology diagram



© Ezassay Biotechnology, Inc 04

核酸与蛋白产品专业提供商
Professional supplier of point-of-care test products

EZ assay 深圳易致生物科技有限公司

www.ezassay.com
info@ezassay.com