



CRISPR/Cas13a RNA检测试剂盒(一管法) (液体)(恒温-荧光型)

CRISPR-Cas13a RNA fluorescent detection kit
(1-tube) (liquid)

✉ info@ezassay.com

🌐 www.ezassay.com

深圳易致生物科技有限公司

目录编号: R-F-CAS13-1S

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

Cas13a与crRNA形成功能复合物，在目标核酸序列上“滑行”，成功配对后，Cas13a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Cas13a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

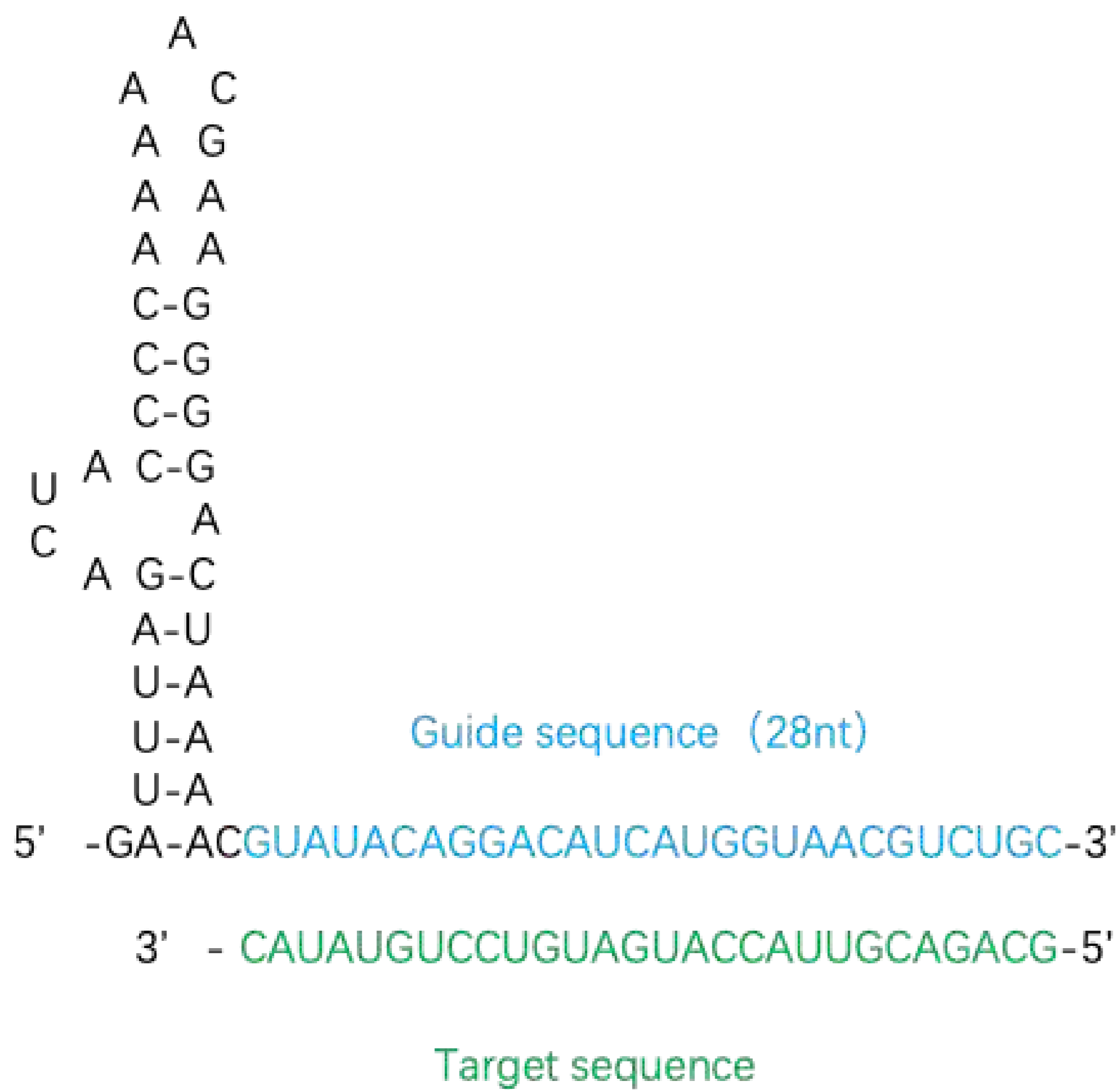
序号	Item	size
1	Detection Buffer (2X)	1000 µl
2	P-mix (10X)	200 µl
3	E-mix (10X)	200 µl
4	Positive Control (10X) (primer, crRNA and RNA template included)	30 µl
5	Starter (10X)	200 µl
6	Cas13a Protein (10µM)	20 µl
7	Cas13a Diluent Buffer	100 µl
8	NTP Mix (25mM each)	100 µl
9	T7 RNA Polymerase (40X)	50 µl

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>）
注意：引物设计时需加上 T7 启动子：5' -TAATACGACTCACTATAG-3'
5. crRNA/gRNA：与LwaCas13a结合，形成功能复合物，被目标序列特异性激活。
(LwaCas13a crRNA scaffold sequence结构序列:: 5' - GAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAAC-3')

LwaCas13a crRNA



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

RNA 模板

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

- 冰上融化试剂并混匀。
- 提前打开荧光PCR仪并把反应温度设置为39°C，关闭热盖功能或把热盖设置为42°C。
- 以配制20 μL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40μL) (注意：冰上操作)：

序号	名称	体积
01	Detection Buffer (2X)	10 μ l
02	NTP Mix (25mM each)	0.8 μ L
03	P-mix (10X)	2 μ L
04	E-mix (10X)	2 μ L
05	T7 RNA Polymerase (40X)	0.5 μ l
06	Forward Primer (20 μ M) Reverse Primer (20 μ M)	0.5 μ l 0.5 μ l
07	crRNA (Cas13a) (2 μ M)	0.2 μ L
08	RNA template*	X μ L
09	Starter (10X) **	2 μ L
10	Nuclease-free H2O	To a total volume of 20 μ l

*无模板对照组用Nuclease-free H2O替代RNA template;

阳性对照组加入2 μ L Positive control

模板加样量为0.5~2 μ L

**最后加入Starter启动液，混匀。

***试剂盒组分已包含Reporter.

- 混匀上述体系，并短暂离心
- 使用Cas13a Diluent Buffer把Cas13a Protein (10 μ M) 稀释为2 μ M (稀释5倍)，在PCR管盖上加2 μ L 稀释后的Cas13a Protein
- 将反应管置于荧光PCR仪 (FAM通道)，39 $^{\circ}$ C条件下反应15 ~ 30 min。
- 取出反应管短暂离心，混匀，再短暂离心。
- 将反应管重新放置于荧光PCR仪 (FAM通道)，39 $^{\circ}$ C条件下反应15 ~ 30 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42°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，请注意扩增后不要开盖，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）。