



# CRISPR/Cas13a RNA检测试剂盒(二步法) (冻干)(恒温-荧光型)

CRISPR-Cas13a RNA detection kit (2-step) (lyophilized)

✉ [info@ezassay.com](mailto:info@ezassay.com)

🌐 [www.ezassay.com](http://www.ezassay.com)

深圳易致生物科技有限公司

目录编号: R-F-CAS13-LYO-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

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  | Reaction Buffer (2X)   | 1000 $\mu$ l |
| 2  | Reaction Tube  | 96孔          |
| 3  | Positive Control (10X)<br>(primer and RNA template included) | 30 $\mu$ l   |
| 4  | Cleavage Buffer (10X)  | 240 $\mu$ l  |
| 5  | Trans Mix (5X)   | 400 $\mu$ l  |
| 6  | T7 RNA Polymerase (40X)                                      | 50 $\mu$ l   |
| 7  | Cas13a Protein (10 $\mu$ M)                                  | 20 $\mu$ l   |
| 8  | Reporter (4 $\mu$ M)   | 80 $\mu$ l   |
| 9  | Cas13a Diluent Buffer  | 100 $\mu$ l  |
| 10 | crRNA for Positive Control (20X)                             | 20 $\mu$ l   |
| 11 | Starter (10X)  | 200 $\mu$ 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>）

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

## 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

- 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，在每孔Reaction Tubes中加入 (注意：冰上操作)：

| 序号 | 名称   | 体积                              |
|----|--|---------------------------------|
| 01 | Reaction Buffer (2X)                                       | 10 $\mu$ l                      |
| 02 | Forward Primer (20 $\mu$ M)<br>Reverse Primer (20 $\mu$ M) | 0.5 $\mu$ l<br>0.5 $\mu$ l      |
| 03 | RNA template*  | x $\mu$ l                       |
| 04 | Starter (10X) **   | 2 $\mu$ l                       |
| 05 | Nuclease-free H2O  | To a total volume of 20 $\mu$ l |

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

阳性对照组加入2  $\mu$ L Positive control (primer and RNA template included)

如模板浓度高推荐模板加样量为1 $\mu$ L,  $x \leq 5 \mu$ L

\*\*最后加入Starter。

- 轻弹数次混匀，稍微离心（避免涡旋剧烈震荡），重复3次
- 39~ 41 $^{\circ}$ C 孵育20~40分钟（推荐39 $^{\circ}$ C，请注意金属浴贴合不紧，温度不准。水浴锅或者PCR仪温度较准确）
- 使用Cas13a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  $\mu$ 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 $\mu$ l) (注意：冰上操作):

| 序号 | 名称                              | 体积                              |
|----|---------------------------------|---------------------------------|
| 01 | Cleavage Buffer (10X)           | 2 $\mu$ l                       |
| 02 | Trans Mix (5X)                  | 4 $\mu$ l                       |
| 03 | T7 RNA Polymerase (40X)         | 0.5 $\mu$ l                     |
| 04 | Reporter (4 $\mu$ M)            | 0.6 $\mu$ l                     |
| 05 | Cas13a Protein (2 $\mu$ M) *    | 1 $\mu$ l                       |
| 06 | crRNA (Cas13a) (0.4 $\mu$ M) ** | 1 $\mu$ l                       |
| 07 | 扩增产物 ***                        | x $\mu$ l                       |
| 08 | Nuclease-free H2O               | To a total volume of 20 $\mu$ l |

\*使用Cas13a Diluent Buffer 把Cas13a protein (10 $\mu$ M) 稀释为Cas13a protein (2 $\mu$ M)

\*\*阳性对照组把“crRNA for Positive control (20X)”加入1 $\mu$ 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 $\mu$ L,  $x \leq 5\mu$ L

试剂盒组分已包含Reporter.

- 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)