



CRISPR/Cas12a RNA检测试剂盒(二步法) (冻干)(恒温-试纸条型)

CRISPR-Cas12a RNA detection kit
(2-step)(lyophilized)(paper strip)

✉ info@ezassay.com

🌐 www.ezassay.com

深圳易致生物科技有限公司

目录编号: R-L-CAS12-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
结果判读	4
原理示意图	5
注意事项	6

产品简介

Brief introduction

以目标RNA为模板，经过RT-RAA恒温扩增，得到大量DNA扩增产物。Cas12a与crRNA形成功能复合物，在DNA的扩增产物上“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）。这一特点可被用于分子诊断领域，实现对病原体的检测。本试剂盒将恒温扩增技术（37°C~ 42°C）与Cas12a的特性结合在一起，实现RNA超灵敏快速检测。

试剂盒组成

Materials supplied

序号	Item	size
1	Reaction Buffer (2X)	1000 μ l
2	Reaction Tube	96孔
3	Positive Control (10X) (primer and RNA template included)	30 μ l
4	Cleavage Buffer (10X)	240 μ l
5	Cas12a Protein (10 μ M)	20 μ l
6	crRNA for Positive Control (20X)	20 μ l
7	Reporter (4 μ M)	500 μ l
8	Starter (10X)	200 μ l
9	Diluent	10 mL

需要但未提供的材料

Other materials required

1. 核酸检测试纸条（FAM-Biotin产物，推荐EZassay货号：CS- FMBO-96）
2. 恒温设备（例如金属浴、水浴、PCR仪等）
3. 移液器
4. Nuclease-free water
5. 目标序列特异性引物（恒温扩增用）（在线设计：<https://ezassay.com/primer>）

序号	名称	体积
01	Reaction Buffer (2X)	10 μ l
02	Forward Primer (20 μ M) Reverse Primer (20 μ M)	0.5 μ l 0.5 μ l
03	RNA template*	x μ l
04	Starter (10X) **	2 μ l
05	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 (primer and RNA template included)。

如模板浓度高推荐模板加样量为1 μ L, x \leq 5 μ L

**最后加入Starter混匀。

- 混匀（弹或上下倒置甩匀），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Cas12a检测特异性目标序列，提前打开恒温设备并把反应温度设置为37 $^{\circ}$ C，若使用PCR或qPCR仪请关闭热盖加热功能或把热盖设置为45 $^{\circ}$ C（需确保热盖温度没有过高）。

以配制20 μ l反应体系为例 (注意：冰上操作)：

序号	名称	体积
01	Cleavage Buffer (10X)	2 μ l
02	Reporter (4 μ M) *	0.25 μ l
03	Cas12a Protein (1 μ M) **	1 μ l
04	crRNA (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

*该reporter用量为消线法的使用浓度（反应终浓度50nM），可搭配本公司核酸测试纸条-消线法使用（货号：CS-FMBO-96）。若搭配本公司CRISPR核酸测试纸条（货号：HD-FMBO-96）则需要提高reporter反应终浓度为500nM~1000nM之间，具体浓度需要根据目标的实验结果优化（该试纸条为张锋论文采用的方法，但是reporter浓度需要准确调教，因此本试剂盒采用消线法），可采购本公司Cas12a 切割底物-ssDNA-试纸型（货号：DNA-FAM-BIO）。（由于CRISPR核酸测试纸条（货号：HD-FMBO-96）本身原理的原因，在试纸条上上样的样品中的reporter浓度过低或过高都会导致假阳性，因此应该根据具体实验优化反应的reporter浓度和上样的reporter浓度，上样的样品中的reporter浓度应高于100nM，具体应根据实验结果优化）

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

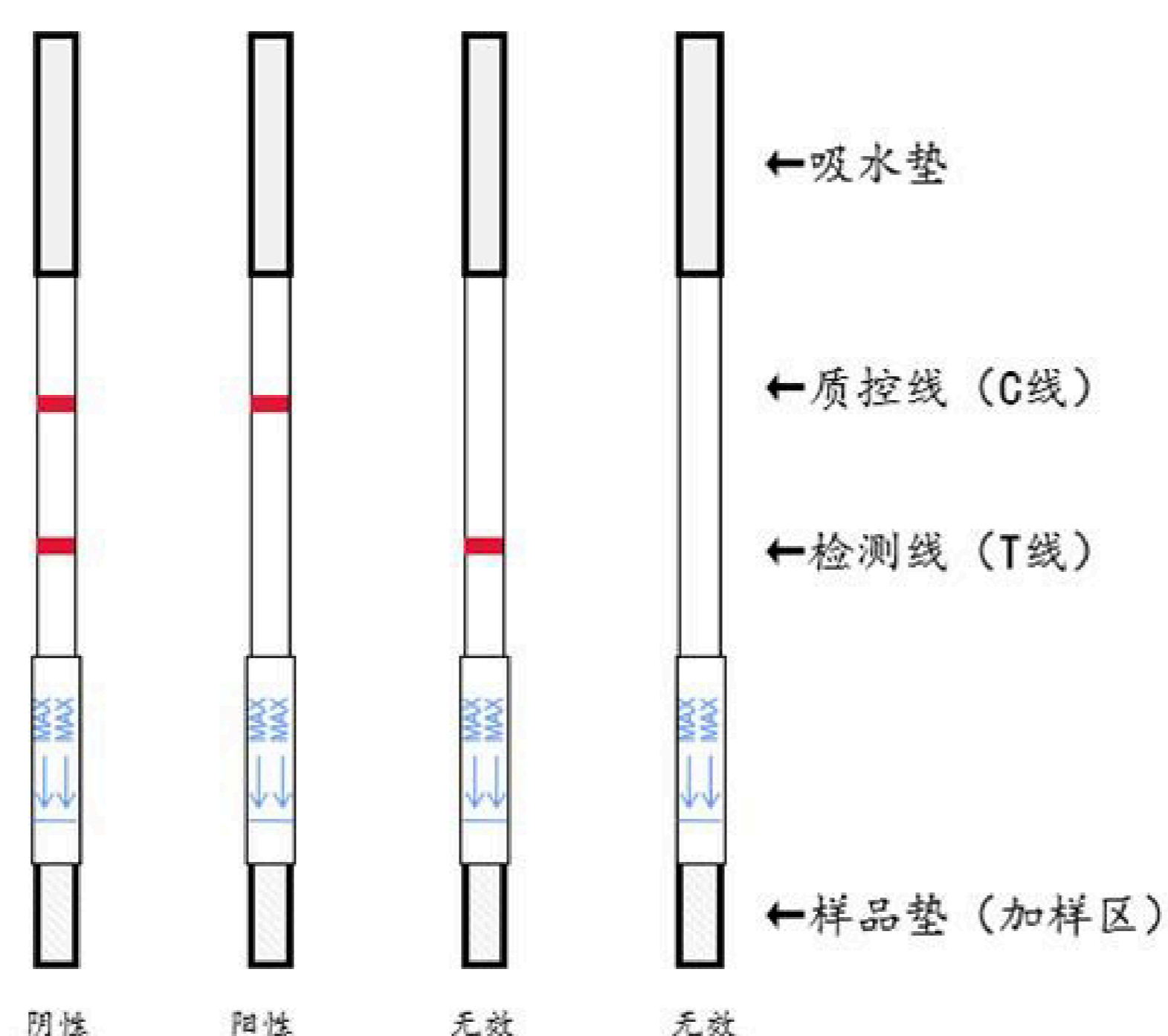
***阳性对照组把“crRNA for Positive Control（20X）”加入1 μ L，其他反应加入目标序列的特异性crRNA

****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2 μ L，x \leq 5 μ 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37 $^{\circ}$ C条件下反应30~60 min。
- 取1~10 μ L反应产物在离心管中用稀释液稀释9~200倍，混匀；（例如取2 μ L核酸扩增产物加入78 μ L Diluent稀释）
- 取70 μ L稀释的反应产物滴于核酸测试纸条，5分钟内记录判读区检测结果
- 记录检测结果后，将试纸条密封后丢弃在安全处。

结果判读（消线法）

Result judgment



- 阴性:

检测线(Test Line, T线)有条带,同时质控线(Control Line, C线)也有条带。阴性结果表明样本中不含待检测目的核酸或者其含量低于试纸条最低检出量。(Cas 蛋白酶没被激活, Reporter没有被切割, T线显色)。

- 阳性:

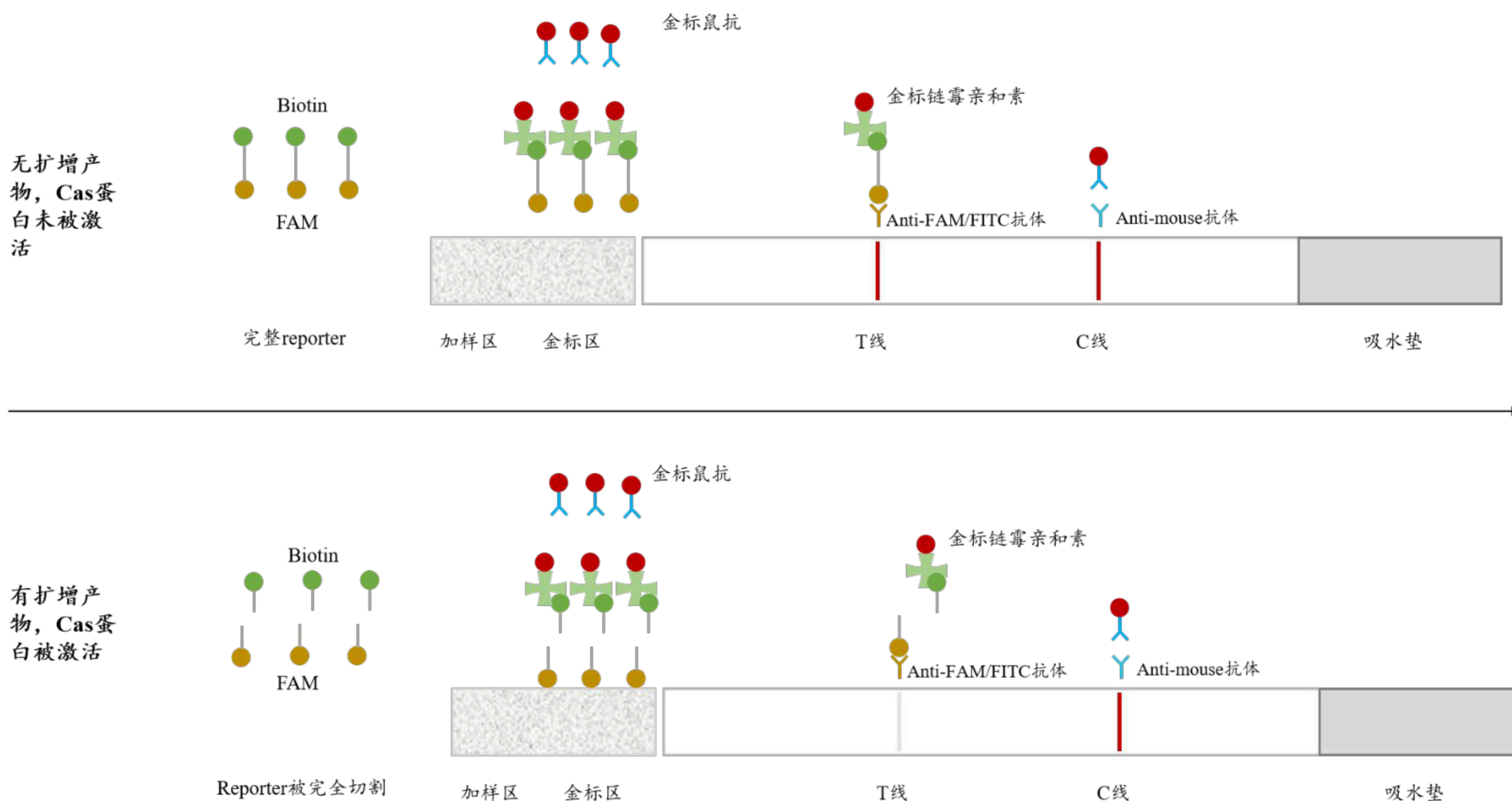
检测线(Test Line, T线)无条带,同时质控线(Control Line, C线)有条带。阳性结果表明样本中含有待检测的目的核酸片段。(Cas 蛋白酶被激活, Reporter被切割, T线不显色)。

- 无效:

质控线(Control Line, C线)无条带或质控线(Control Line, C线)和检测线(Test Line, T线)均无条带,此结果提示所使用试纸条失效,损坏或操作有误。

原理示意图

Schematic Diagram of Principle



注意事项

Notes

- 若体系中Reporter过量会导致假阳性，建议浓度为20nM ~120nM。具体实验应根据Cas蛋白浓度，反应时间等因素来调整Reporter用量。
- 如果使用PCR仪器，请提前关闭热盖功能把热盖设置为45°C。
- 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）。