



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

🌐 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 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	Trans Mix (5X)	400 μ l
6	T7 RNA Polymerase (40X)	50 μ l
7	Cas13a Protein (10 μ M)	20 μ l
8	Reporter (4 μ M)	80 μ l
9	Cas13a Diluent Buffer	100 μ l
10	crRNA for Positive Control (20X)	20 μ l
11	Starter (10X)	200 μ l

需要但未提供的材料

Other materials required

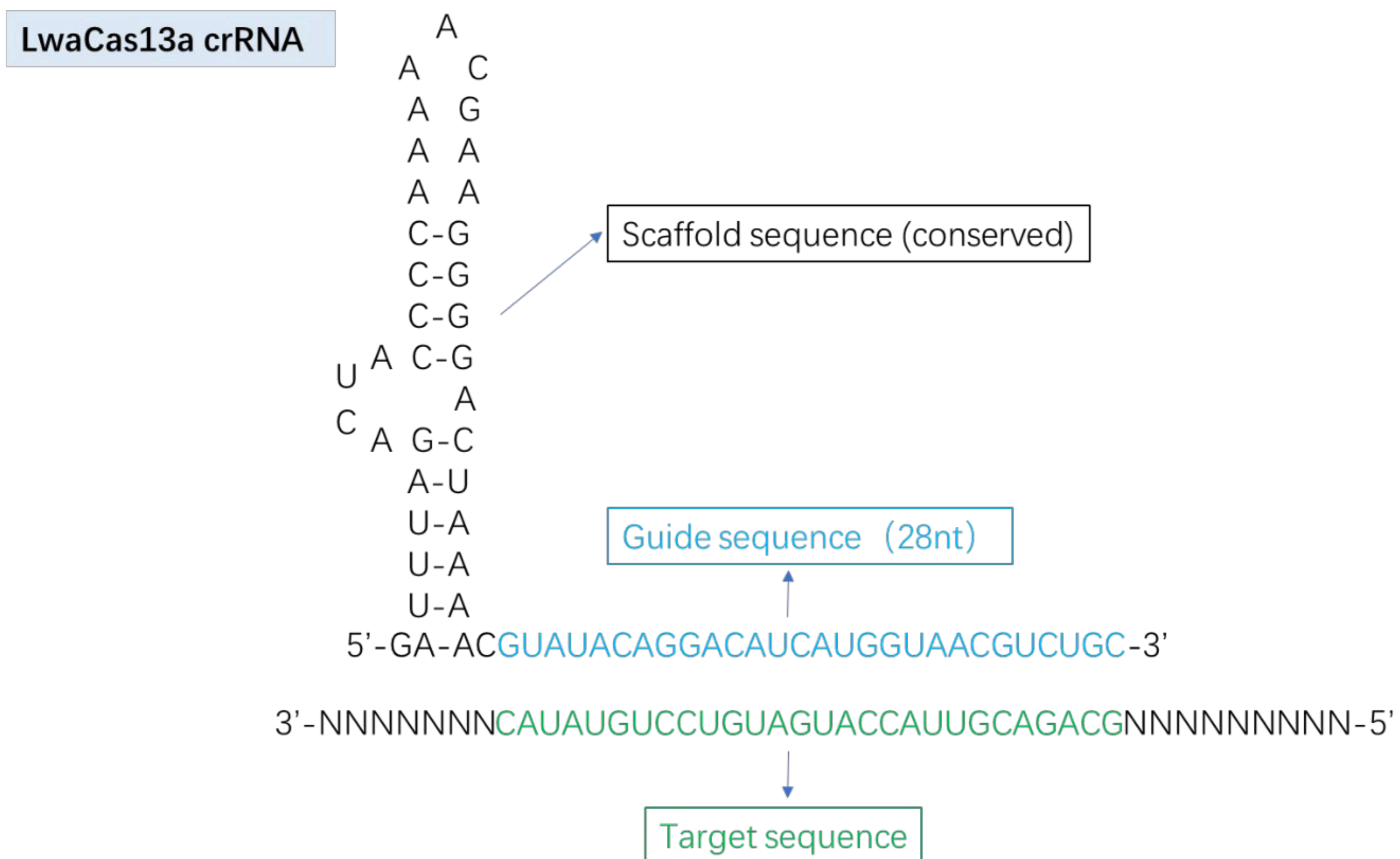
1. 荧光仪，读FAM信号（例如qPCR仪）
2. 移液器
3. Nuclease-free water

4. 目标序列特异性引物（恒温扩增用）（在线设计：<https://ezassay.com/primer>）

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')



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 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, $x \leq 5 \mu$ 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 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	Trans Mix (5X)	4 μ l
03	T7 RNA Polymerase (40X)	0.5 μ l
04	Reporter (4 μ M)	0.6 μ l
05	Cas13a Protein (2 μ M) *	1 μ l
06	crRNA (Cas13a) (0.4 μ M) **	1 μ l
07	扩增产物 ***	x μ l
08	Nuclease-free H2O	To a total volume of 20 μ l

*使用Cas13a Diluent Buffer 把Cas13a protein (10 μ M) 稀释为Cas13a protein (2 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
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)
- 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)。