



CRISPR/Cas13a RNA检测试剂盒(二步法) (冻干)(恒温-试纸条型)

CRISPR-Cas13a 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-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	2
储存	2
检测样品	2
检测步骤	3
结果判读	5
原理示意图	6
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，得到大量含T7启动子的DNA扩增产物。T7 RNA聚合酶转录出RNA。Cas13a与crRNA形成功能复合物，与目标RNA配对后，Cas13a被特异性激活，反式切割周围的单链RNA。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Cas13a的特性结合在一起，实现RNA超灵敏快速检测。它采用升级后的LwaCas13a蛋白，相较于野生型LwaCas13a蛋白活性提升50%，检测效果更佳！

试剂盒组成

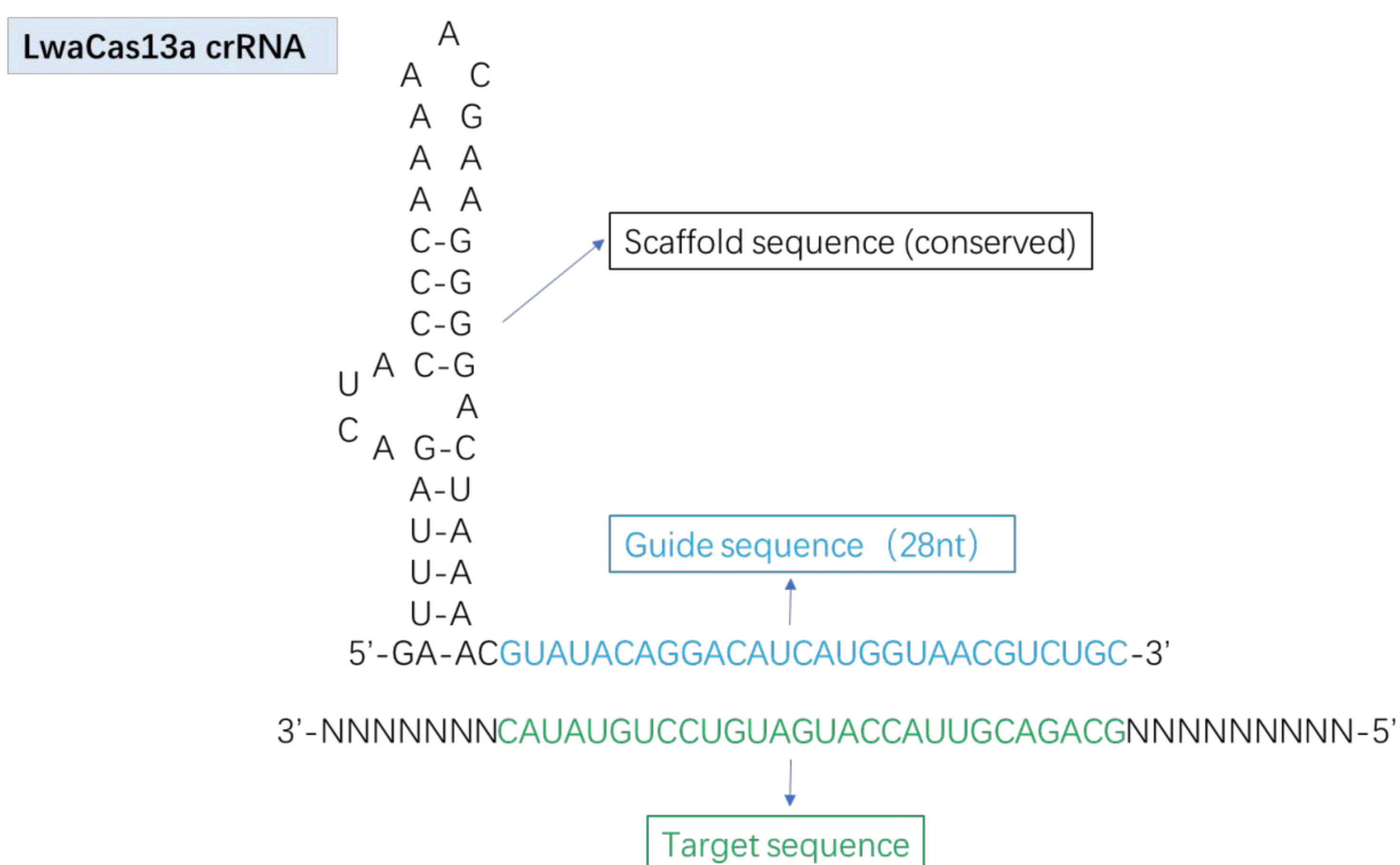
Materials supplied

序号	Item	size
1	Reaction Buffer (2X)	1000 µl
2	Reaction Tube	96孔
3	Positive Control (10X) (primer and RNA template included)	30 µl
4	Cleavage Buffer (10X)	240 µl
5	Trans Mix (5X)	400 µl
6	Reporter (4µM)	500 µl
7	T7 RNA Polymerase (40X)	50 µl
8	Cas13a Protein (10µM)	20 µl
9	Cas13a Diluent Buffer	100 uL
10	crRNA for Positive Control (20X)	20 µl
11	Starter (10X)	200 µl
12	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>)
注意: 引物设计时需加上 T7 启动子: 5' -TAATACGACTCACTATAG-3'
6. 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 μ l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)	0.5 μ l
	Reverse Primer (20 μ M)	0.5 μ l
03	RNA template*	x μ l
04	Starter (10X) **	2 μ l
05	Nuclease-free H ₂ O	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（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Cas13a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	Trans Mix (5X)	4 μ l
03	Reporter (4 μ M) *	0.25 μ l

04	T7 RNA Polymerase (40X)	0.5 μ l
05	Cas13a Protein (2 μ M) **	1 μ l
06	crRNA(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

*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Cas13a 切割底物-ssRNA-试纸型（货号：RNA-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）

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

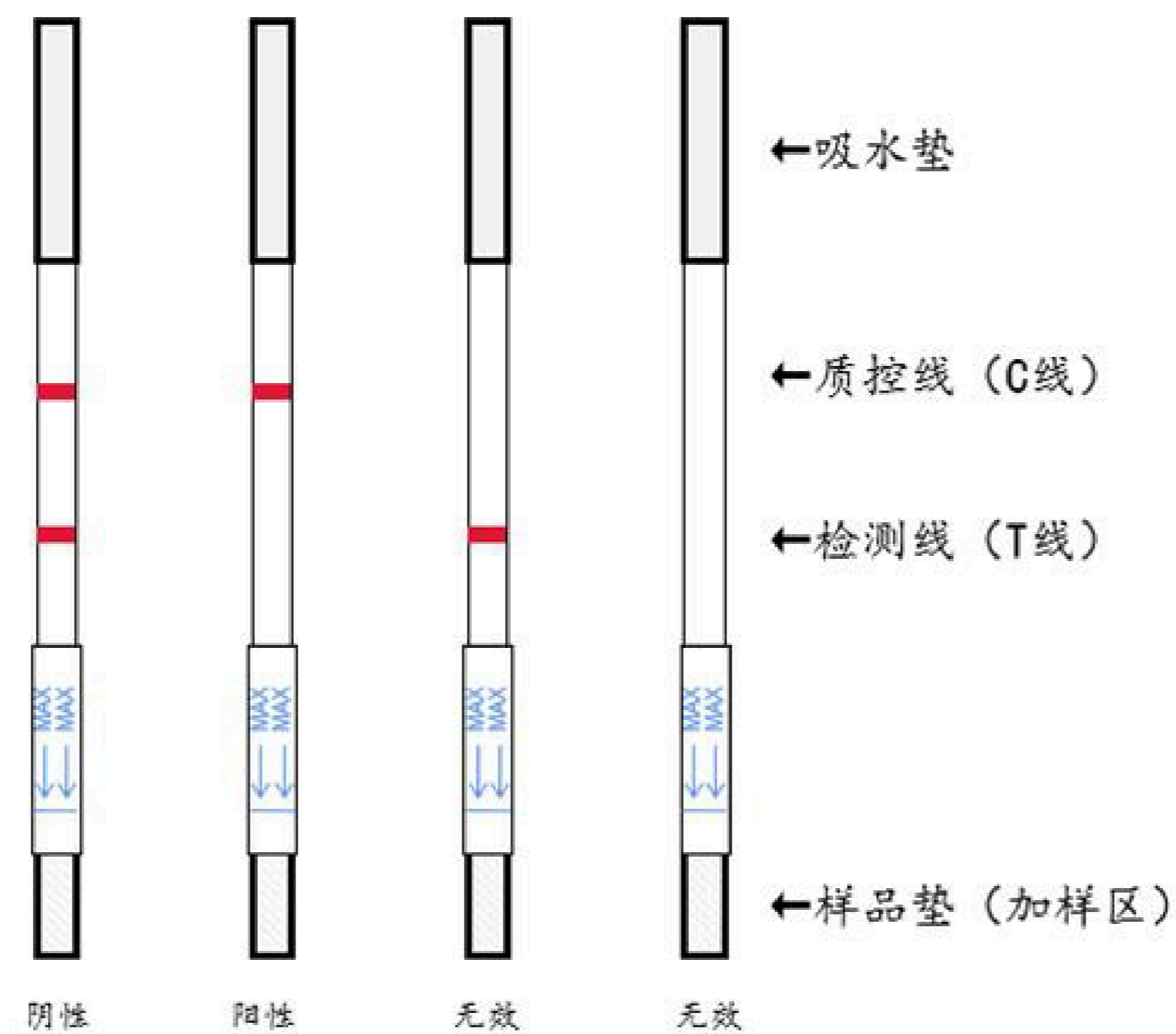
***阳性对照组把“crRNA for Positive control (20X)” 加入1 μ l，其他反应加入目标序列的特异性crRNA

****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 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 °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：

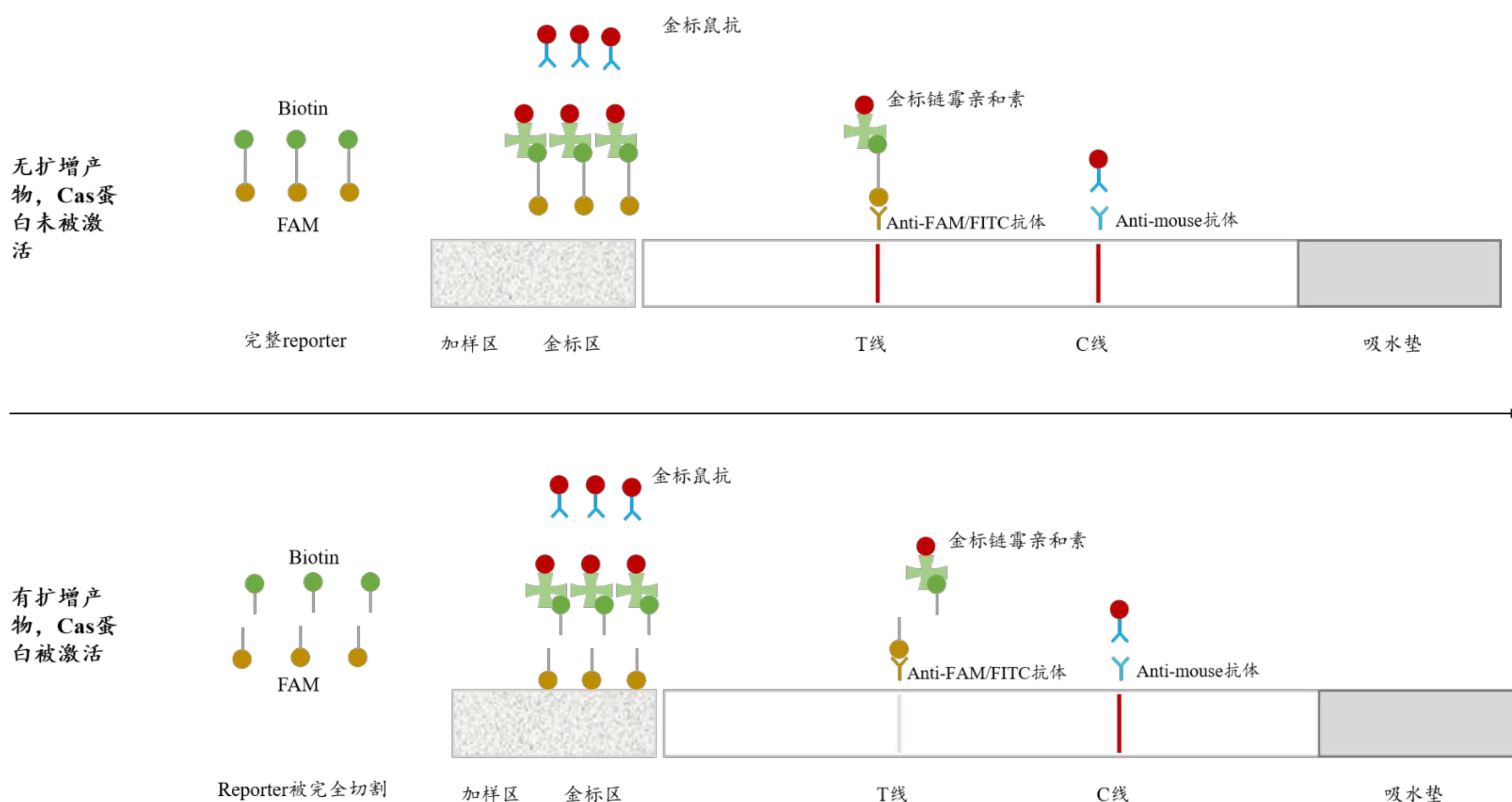
检测线(Test Line, T线)无条带，同时质控线(Control Line, C线)有条带。阳性结果表明样本中含有待检测的目的核酸片段。（Cas 蛋白酶被激活，Reporter被切割，T线不显色）

- 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）。