



CRISPR Guide RNA 转录试剂盒 (高产型)

High-Yield CRISPR Guide RNA Synthesis Kit

✉ info@ezassay.com

🌐 www.ezassay.com

深圳易致生物科技有限公司

目录编码: SG-RNA-001
SG-RNA-010

目录 CONTENTS

内容	页码
产品简介	1
试剂盒组成	1
储存条件	1
操作步骤	1
注意事项	5

产品简介

Brief introduction

本CRISPR gRNA转录试剂盒内置高效的T7 RNA Polymerase Mix，可从少量模板中高效合成gRNA，广泛兼容Cas12a、Cas13a、Cas12b、Cas9等系统。其卓越的转录性能尤为突出，仅需0.5 μ g对照模板，单次反应便能产出高达百微克的目标gRNA。

试剂盒组成

Materials supplied

序号	CRISPR guide RNA 体外转录试剂盒	Cat.: SG-RNA-001 (48T)	Cat. SG-RNA-010 (48T*10)
01	T7 Reaction Buffer(10 ×)	250 μ L	250 μ L*10
02	T7 RNA Polymerase Mix	100 μ L	100 μ L*10
03	NTP Mix(25 mM each)	200 μ L	200 μ L *10
04	Positive control	10 μ L	10 μ L*10
05	DNase I Buffer(10 ×)	500 μ L	500 μ L *10
06	DNase I	50 μ L	50 μ L*10
07	RNase inhibitor	50 μ L	50 μ L*10
08	Purification Buffer	500 μ L	500 μ L*10
09	RNase-free ddH ₂ O	2mL	2mL*10

储存条件

storage condition

-20 $^{\circ}$ C 保存，于-20 ~ 0 $^{\circ}$ C运输。▲避免反复冻融。

操作步骤

Operation steps

(一) 准备DNA模板

DNA模板可通过合成和/或PCR扩增获得。

1. 合成DNA模板

人工合成的单链或双链DNA片段（需包含T7启动子序列及目标转录区域）可直接用作体外转录模板。

2. 质粒模板（可选）

将上述片段插入载体骨架，构建质粒模板。将重组质粒转化至大肠杆菌中进行扩增，即可大量制备质粒DNA。

建议：使用限制性内切酶在待转录片段的下游进行线性化处理，并建议对线性化产物进行纯化，以提高后续体外转录效率。

3. PCR产物模板（可选）

或直接使用PCR扩增产物（需包含T7启动子序列及目标转录区域）作为模板。

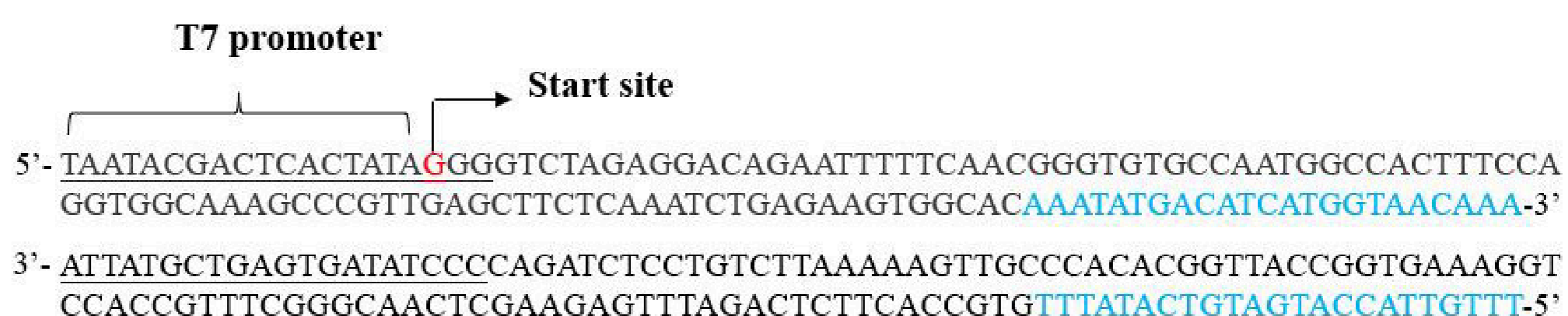
建议对PCR产物进行纯化后再进行转录反应，以提高转录效率。

DNA模板及转录序列设计示例：

(1) AapCas12b sgRNA:

AapCa12b
sgRNA

Prepare DNA
template for
transcription



In vitro
transcription



Scaffold sequence (conserved)

DNA spacer, is also called guide sequence.
It is design according to target sequence.

(2) BrCas12b sgRNA:

BrCas12b sgRNA

Prepare DNA template for transcription

T7 promoter → **Start site**

5'- TAATACGACTCACTATA **GGG**GAAGGTGGTTAGCTACAGGCTGACCAGTGCAGTTGTGTCATGTGCTAC
GGTGACCTAACACGTCAGTCAGTCACAACGGCTATCTATATTTCCACTAACCAAAGTTAGTGGAATGT
AGATGGTTAGCAC **AAATATGACATCATGGTAACAAA**-3'

3'- ATTATGCTGAGTGATATCCCCTTCCACCAATCGATGTCCGACTGGTCACGTCAACACAGTACACGATG
CCACTGGATTGTGCAGTGAGTCAGTGTGCCGATAGATATAAAGGTGATTGGTTTCAATCACCTTTACA
TCTACCAATCGT **TTTATACTGTAGTACCATTGTTT**-5'

In vitro transcription

sgRNA:

5'- GGGGAAGGUGGUUAGCUACAGGCUGACCAGUGCAGUUGUGUCAUGUGCUACGGUGACCUAACACG
UCACUCAGUCACAACGGCUAUCUAUAUUUCCACUAACCAAAGUUAGUGGAAAUGUAGAUGGUUAG
CAC **AAAUAUGACAUCAUGGUAACAAA**-3'

DNA spacer, is also called guide sequence.
It is design according to target sequence.

Scaffold sequence (conserved)

(3) Cas14a sgRNA:

Ca14a sgRNA

Prepare DNA template for transcription

T7 promoter → **Start site**

5'- TAATACGACTCACTATA **GGC**TTCCTGATAAAGTGGAGAACCCTTACCAAAGCTGTCCCTTAGGGGATTAGAAGTTGAG
TGAAGGTGGGCTGCTTGCATCAGCCTAATGTCGAGAAGTGCTTCTTCGGAAAGTAACCCCTCGAAACAAATTCATTTTCCTC
TCCAATTCTGCACAAGAAAGTTGCAGAACCCGAATAGACGAATGAAGGAATGCAAC **AAATATGACATCATGGTAACAAA**-3'

3'- ATTATGCTGAGTGATATCCCGAAGTGACTATTTACCTCTTGCGAAGTGGTTTTTCGACAGGGAATCCCCTAATCTTGAAGTCA
CTCCACCCGACGAACGTAGTCGGATTACAGCTCTTACGAAAGAAGCCTTTCATTGGGAGCTTTGTTAAGTAAAAGGAG
AGGTTAAGACGTGTTCTTCAACGTCTGGGCTTATCTGCTTACTTCCTTACGTTG **TTTATACTGTAGTACCATTGTTT**-5'

In vitro transcription

sgRNA:

5'- GGGCUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCUCUACCAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGC
UGCUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUUCCUCUCCA
UCUGACAAGAAAGUUUCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAGGAUUGCAAC **AAAUAUGACAUCAUGGUAACAAA**-3'

Scaffold sequence (conserved)

DNA spacer, is also called guide sequence.
It is design according to target sequence.

(二) 转录sgRNA

1. 配置反应体系

以50 μ l反应体积为例*，根据下表配制反应体系：

组分	用量
T7 Reaction Buffer(10 \times)	5 μ L
T7 RNA Polymerase Mix	2 μ L
NTP Mix (25 mM)	4 μ L
RNase inhibitor	1 μ L
Template DNA**	0.5-1 μ g
RNase-free ddH2O	Up to 50 μ L

*配制200 μ L以上时，建议用水浴锅进行加热，并每隔30分钟上下混匀一次；

**阳性对照添加2 μ L Positive Control；

2. 转录反应

i. 轻轻混匀（避免剧烈涡旋），随后短暂离心。

ii. 将反应体系置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1~2小时***，即可完成体外转录并获得较高产量的 RNA。

***合成 RNA 片段较短 (< 300 nt) 时建议 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 - 16 h 或更长时间，过夜不会影响产物质量；

3. DNaseI消化去除DNA模板

i. 向转录反应产物加入40 μ L RNase-free ddH2O.

ii. 然后加入10 μ L DNase I Buffer(10x) 和1 μ L DNase I.

iii. 轻轻混匀，随后短暂离心使液体集中于管底。

iv. 将反应体系置于 37 $^{\circ}$ C 孵育1小时，以消化模板DNA。

4. 纯化sgRNA****

i. 在上述反应产物中添加10 μ L Purification Buffer.

ii. 再加入200 μ L 95%冰乙醇，-30~-20 $^{\circ}$ C放置20分钟。

iii. 12000rpm离心10分钟，小心弃去上清。

iv. 加入500 μ L 75%冰乙醇，12000rpm离心10分钟，小心弃去上清。

v. 重复步骤 (iv) ；

vi. 室温放置2分钟使残余乙醇挥发，然后加入50-100 μ L RNase-free ddH2O溶解 sgRNA.

vii. 将 sgRNA 溶液置于-80°C保存。

****本试剂盒采用乙醇沉淀法进行 sgRNA 纯化。该方法获得的 sgRNA 可满足大多数实验需求。如需更高纯度的 RNA，建议采用柱纯化方法进一步纯化。

5. RNA质量检测

取适量反应产物，采用3%琼脂糖凝胶电泳进行质量分析。

注意事项

Notes

- 使用本产品时，请在洁净操作台，使用RNase-free耗材并穿戴洁净的实验服及全新的一次性乳胶手套和一次性口罩，以避免RNase污染。
- 建议纯化Template DNA，避免RNase、RNA及蛋白残留。
- 进行体外转录合成 RNA时，本产品不仅适用于含有T7 Promoter的线型Plasmid，也适用于带有T7 Promoter序列的PCR产物Oligo DNA等。