



CRISPR guide RNA转录试剂盒v2 (含PCR试剂)

High Yield crRNA/sgRNA Synthesis Kit v2
(PCR mix included)

✉ info@ezassay.com

🌐 www.ezassay.com

深圳易致生物科技有限公司

目录编码: SG-KIT-024
SG-KIT-096

目录 CONTENTS

内容	页码
产品简介	1
试剂盒组成	1
储存条件	1
模板准备	1
操作步骤	4
注意事项	5

产品简介

Brief introduction

CRISPR guide RNA(gRNA) 转录试剂盒内含T7 RNA Polymerase Mix，可以从少量样本得到高效转录，合成gRNA（适用于Cas12a、Cas13a、Cas12b和Cas9等的gRNA制备）。0.5μg对照模板单次反应可获得产量高达百微克左右的gRNA。

试剂盒组成

Materials supplied

序号	CRISPR guide RNA 体外转录试剂盒	Cat.: SG-KIT-024 (24T)	Cat.:SG-KIT-096 (96T)
01	T7 Reaction Buffer(10 ×)	130μL	130μL*4
02	T7 RNA Polymerase Mix	50μL	50μL*4
03	NTP Mix(25 mM each)	100μL	100μL*4
04	Positive control	10μL	10μL*4
05	DNase I Buffer(10 ×)	250μL	250μL*4
06	DNase I	25μL	25μL*4
07	RNase inhibitor	25μL	25μL*4
08	Purification Buffer	250μL	250μL*4
09	RNase-free ddH2O	1mL	1mL*4
10	PCR Master Mix (2X)	350μL	350μL*4
11	PCR Primer Mix (5μM each)	50μL	50μL*4

储存条件

storage condition

-20°C 保存，于-20 ~ 0°C运输。▲避免反复冻融。。

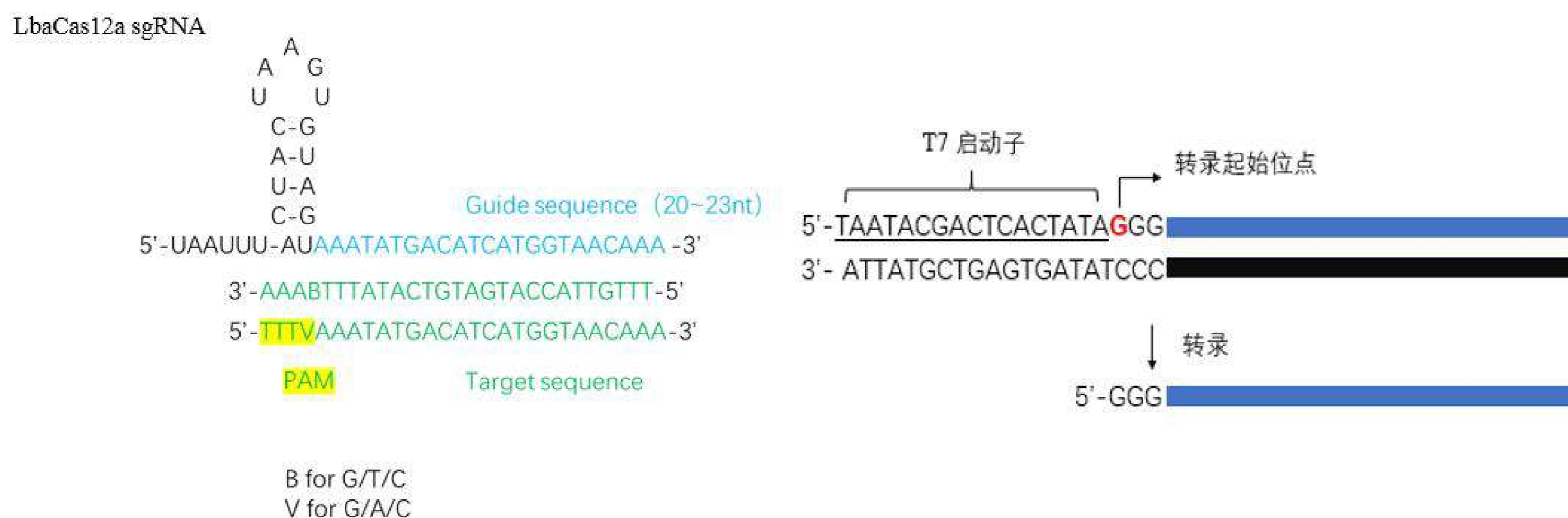
质粒模板准备

Plasmid Template preparation

1、质粒构建

(1) 设计sgRNA：根据不同的Cas蛋白设计不同的sgRNA，sgRNA前需添加T7启动子序列，具体设计参考下图：

① Cas12a（以LbaCas12a的sgRNA为例）：



构建DNA片段

```

5'-TAATACGACTCACTATA GGGTAATTTCTACTAAGTGTAGATAAAATATGACATCATGGTAACAAA-3'
3'-ATTATGCTGAGTGATATCCCATTAAAGATGATTCACATCTATTTATACTGTAGTACCATTGTTT-5
  
```

↓ 转录

sgRNA: 5'-GGGUAAUUUCUACUAAGUGUAGAUAAAUAUGACAUCAUGGUAACAAA-3'

下划线：T7启动子序列 黑色：LbaCas12a Scaffold Sequence序列 蓝色：DNA Spacer

注：DNA Spacer为靶标DNA片段，根据目标区域自行修改

② AapCas12b:



构建DNA片段

```

5'-TAATACGACTCACTATA GGGGTCTAGAGGACAGAATTTTCAACGGGTGTGCCAATGGCCACTTCCAGGTGGCAAAGCCCGTTGAGCTTCTCAAATCTGAGAAAGTGGCA
CAAATATGACATCATGGTAACAAA-3'
3'-ATTATGCTGAGTGATATCCCAGATCTCCTGTCTTAAAAAGTTGCCACACGGTTACCGGTGAAAGGTCCACCGTTTCGGGCAACTCGAAGAGTTAGACTCTTCACCGTG
TTTATACTGTAGTACCATTGTTT-5'
  
```

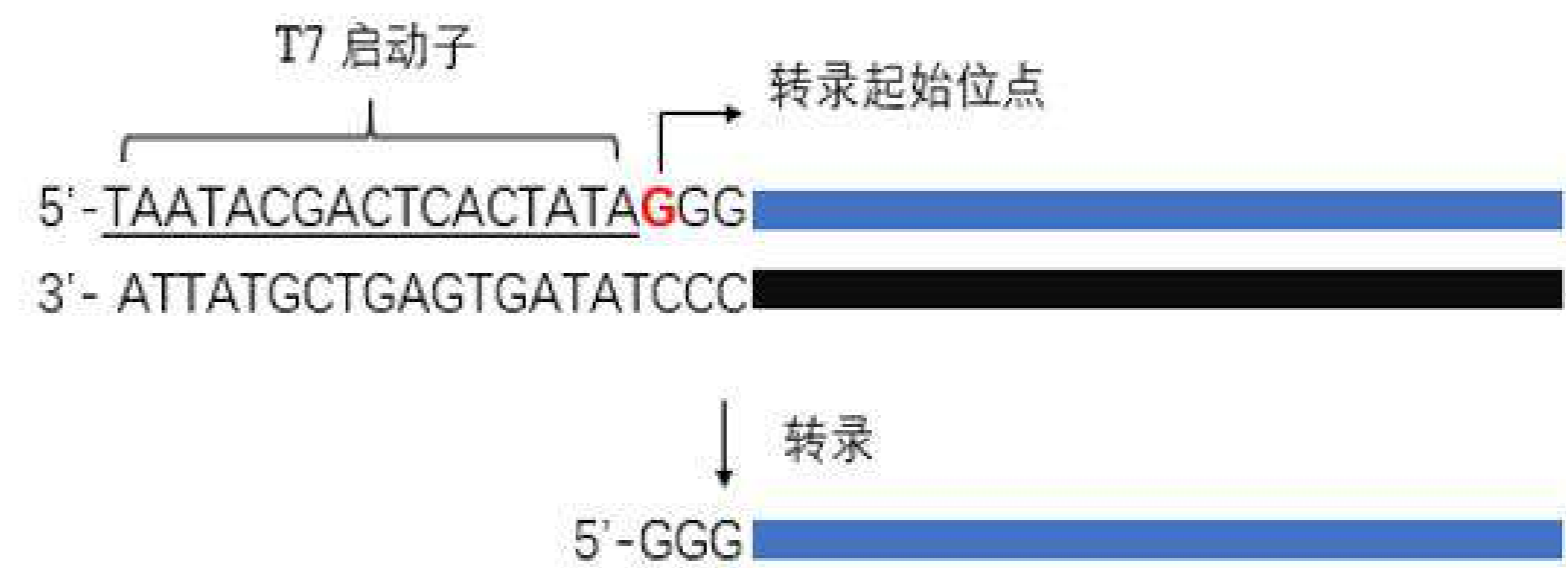
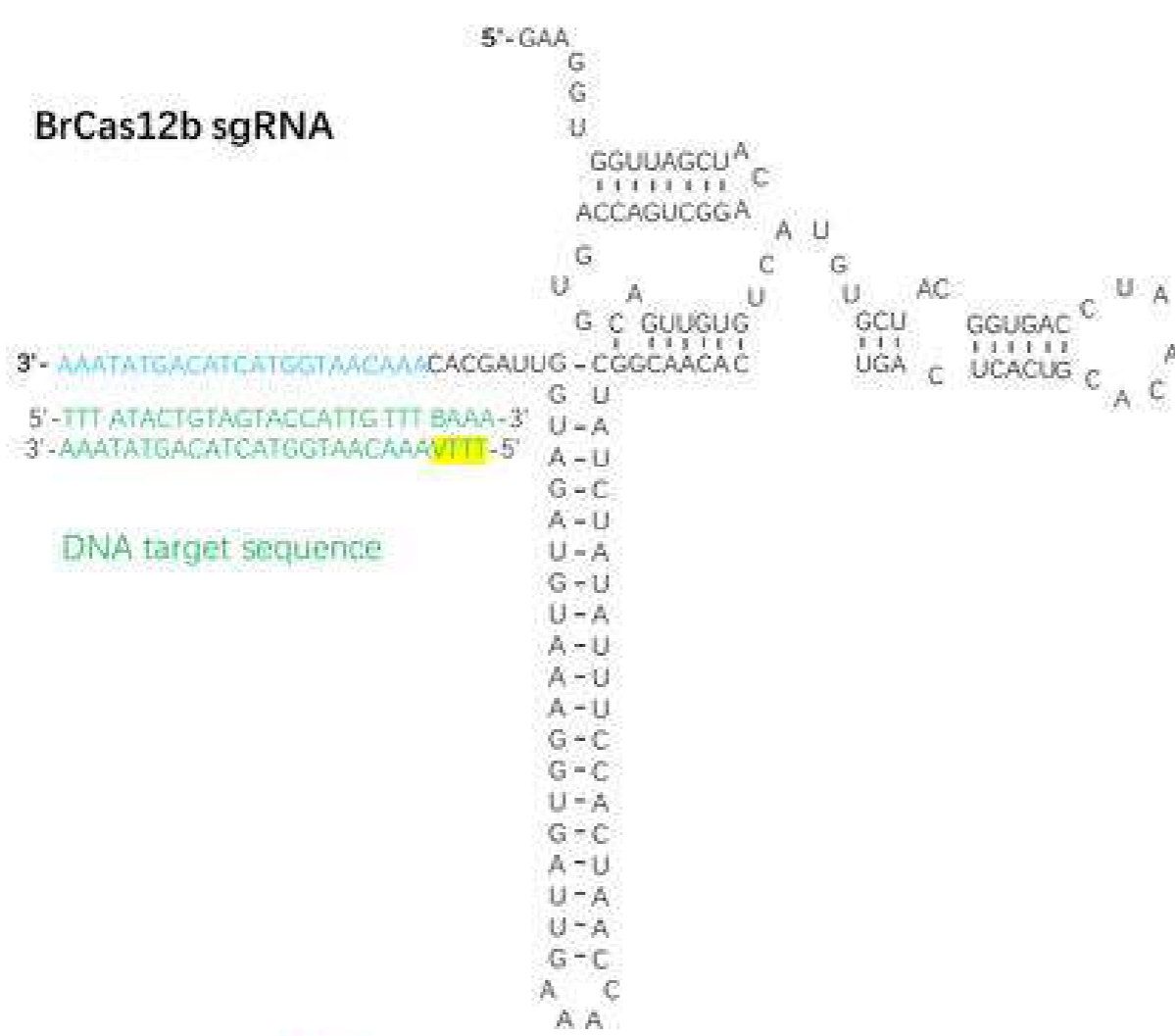
↓ 转录

sgRNA: 5'-GGGGUCUAGAGGACAGAAUUUUUCAACGGGUGUGCCAAUGGCCACUUUCCAGGUGGCAAAGCCCGUUGAGCUUCUCAAUCUGAGAAGUGGCACAAATATGACATCATGGTAACAAA-3'

下划线：T7启动子序列 黑色：AapCas12b Scaffold Sequence序列 蓝色：DNA Spacer

注：DNA Spacer为靶标DNA片段，根据目标区域自行修改

③ BrCas12b:



构建DNA片段

5'- TAATACGACTCACTATAGGGGAAGGTGGTTAGCTACAGGCTGACCAGTGCAGTTGTGTCATGTGCTACGGTGACCTAACACGTCACACTCAGTCACAACGGCTATCTATAT
TTCCACTAACCAAAGTTAGTGGAAATGTAGATGGTTAGCACAAATATGACATCATGGTAACAAA-3'

3'- ATTATGCTGAGTGATATCCCTTCCACCAATCGATGTCCGACTGGTCACGTCAACACAGTACACGATGCCACTGGATTGTGCAGTGAGTCAGTGTGCCGATAGATATAA
AGGTGATTGGTTTCAATCACCTTTACATCTACCAATCGTGTTTATACTGTAGTACCATTGTTT-5'



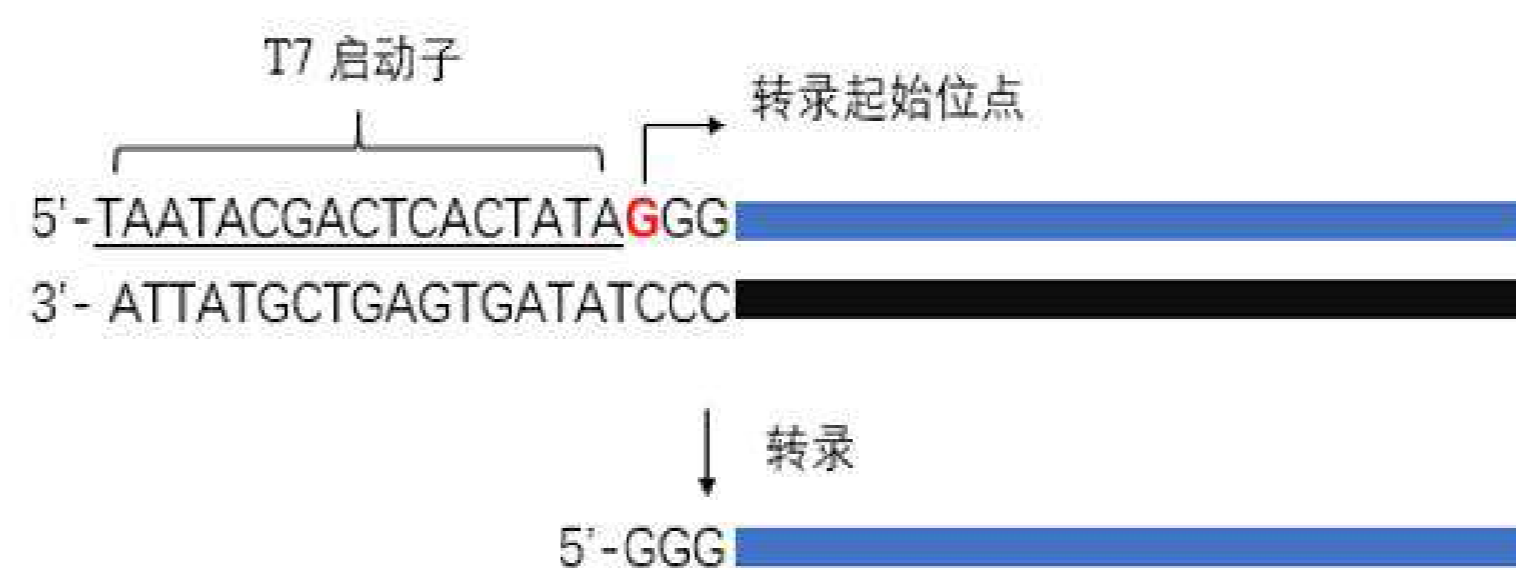
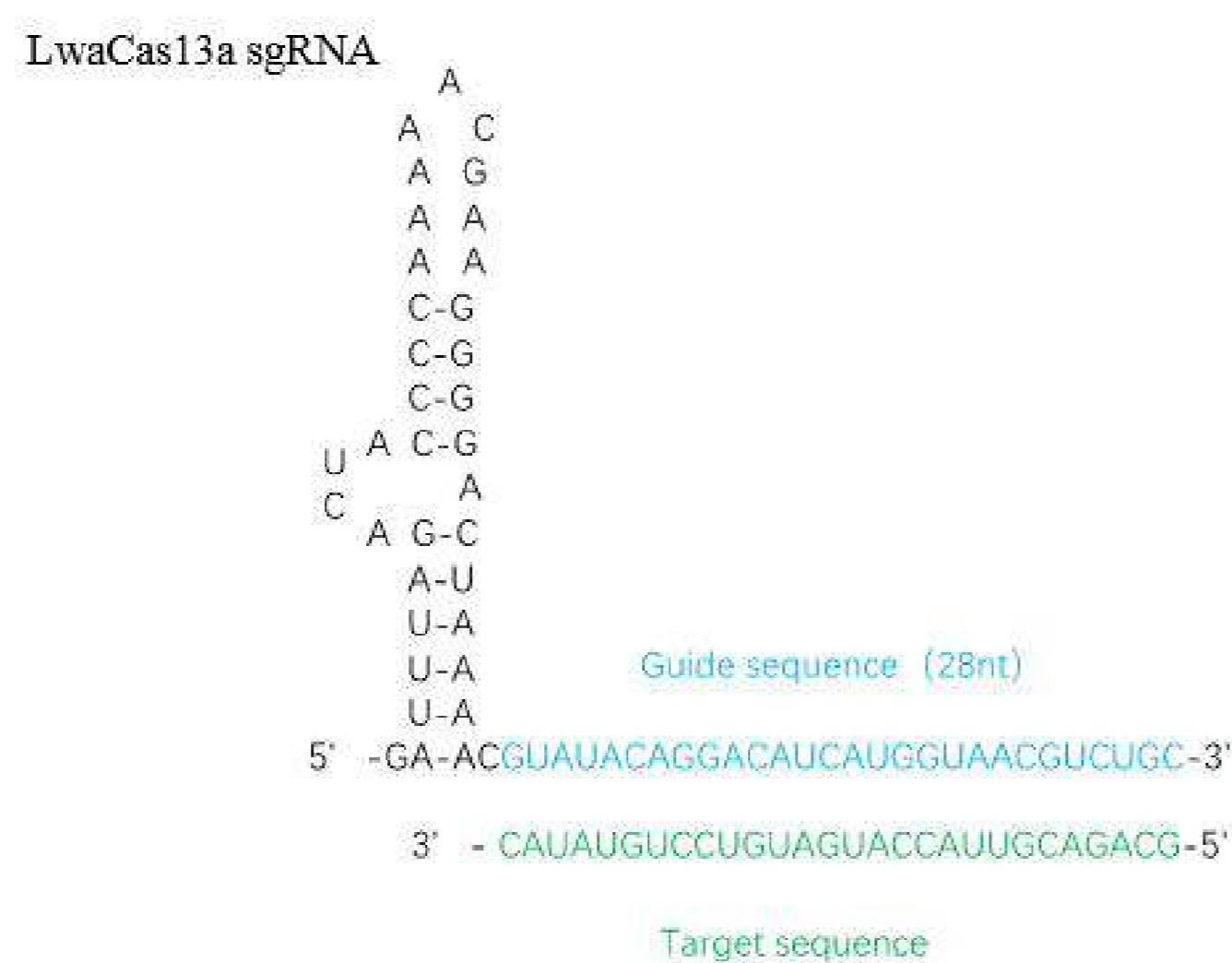
sgRNA:

5'- GGGGAAGGUGGUUAGCUACAGGCUGACCAGUGCAGUUGUGUCAUGUGCUACGGUGACCUAACACGUCACUCAGUCACAACGGCUAUCUAUAUUCACUAACC
AAAGUUAGUGGAAAUAGUAGAUGGUUAGCACAAUAUGACAUCAUGGUAACAAA-3'

下划线: T7启动子序列 黑色: BrCas12b Scaffold Sequence序列 蓝色: DNA Spacer

注: DNA Spacer为靶标DNA片段, 根据目标区域自行修改

④ Cas13a (以LwaCas13a的sgRNA为例) :



构建DNA片段

5'- TAATACGACTCACTATAGGGGATTTAGACTACCCCAAAAACGAAGGGGACTAAAACGTATACAGGACATCATGGTAACGTCTGG-3'

3'- ATTATGCTGAGTGATATCCCCTAAATCTGATGGGGTTTTTGCTTCCCCTGATTTTG CATATGTCCTGTAGTACCATTGCAGACC-5'

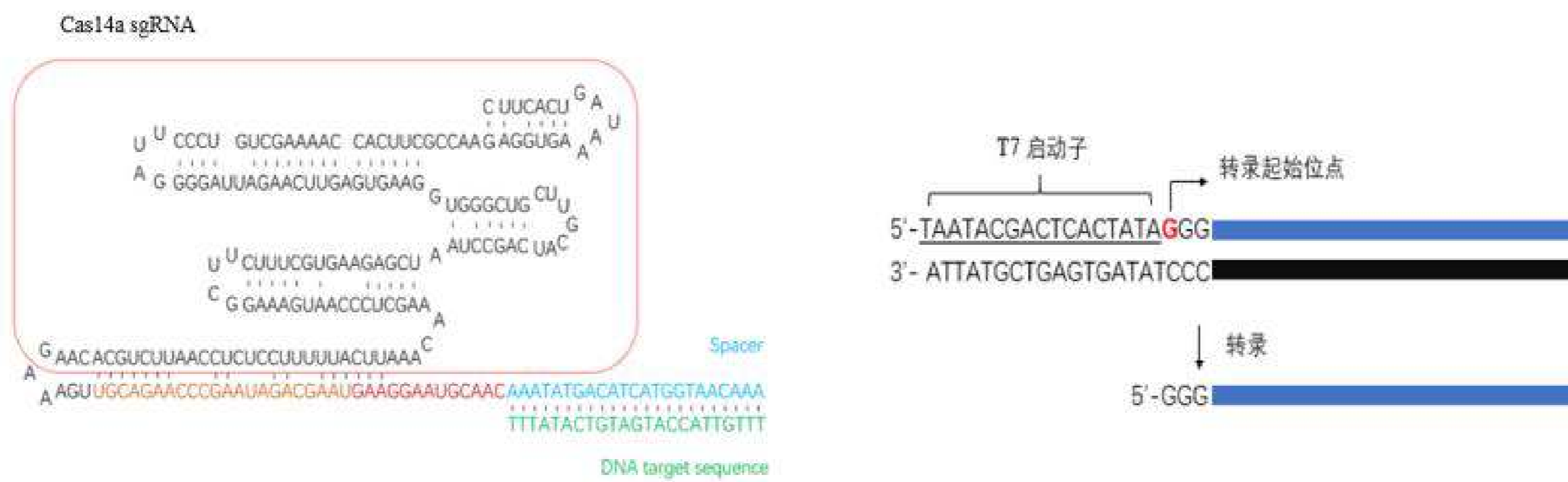


sgRNA: 5'-GGGGAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACGUAUACAGGACAUCAUGGUAACGUCUGC-3'

下划线: T7启动子序列 黑色: LwaCas13a Scaffold Sequence序列 蓝色: DNA Spacer

注: DNA Spacer为靶标DNA片段, 根据目标区域自行修改

⑤ Cas14a:



构建DNA片段

5'- TAATACGACTCACTATACTTCACTGATAAAGTGGAGAACCGCTTCACAAAAGCTGTCCTTAGGGGATTAGAACTTGAGTGAAGGTGGGCTGCTTGCATCAGCCTAATGTCGAGAAGTGCTTCTTCGGAAAGTAACCCTCGAAACAAATTCATTTTCTCTCCAATTCGACACAAGAAAGTTGCAGAACC CGAATAGACGAATGAAGGAATGCAACAAAATATGACATCATGGTAACAAA-3'

3'- ATTATGCTGAGTGATATGAAGTGACTATTTACCTCTTGGCGAAGTGGTTTTCGACAGGGAATCCCTAATCTTGAACCTCACTCCACCCGACGAACGTAGTCGGATTACAGCTCTTCACGAAAGAAGCCTTTCATTTGGGAGCTTTGTTAAAGTAAAAAGGAGAGGTTAAGACGTGTTCTTCAACGTCTTGGGCTTATCTGCTTACTTCTTACGTTGTTATACTGTAGTACCATTGTT-5'

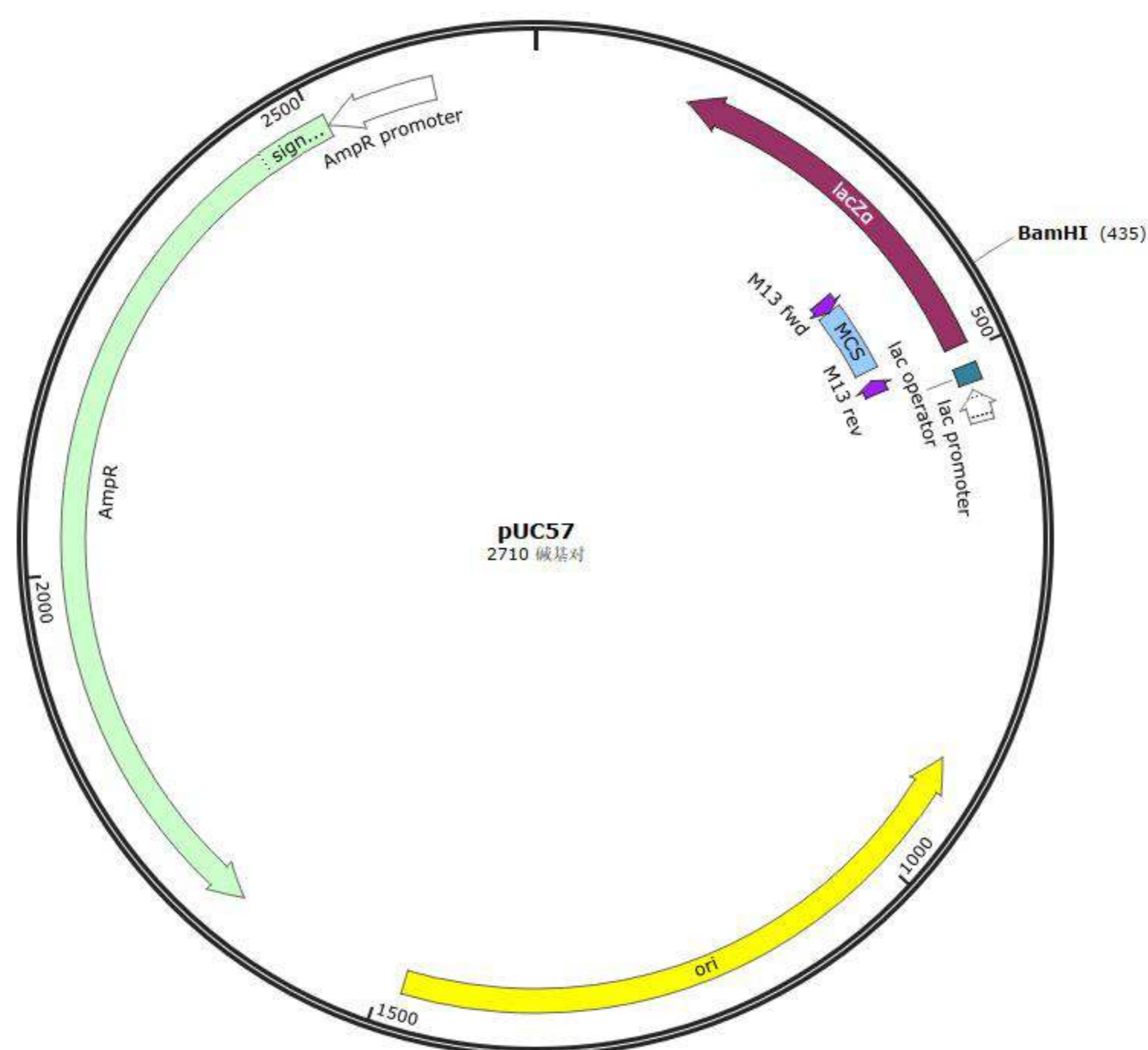
↓ 转录

sgRNA:
5'- CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACAAAAGCUGUCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGUGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGAAAGUAACCCUCGAAACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAUUUCGCACAAGAAAGUUGCAGAACC CGAAUAGACGAAUGAAGGAUUGCAACAAAU AUGACAUCAUGGUAACAAA-3'

下划线: T7启动子序列 黑色: Cas14a Scaffold Sequence序列 蓝色: DNA Spacer

注: DNA Spacer为靶标DNA片段, 根据目标区域自行修改

(2)、质粒构建: 将上述根据不同Cas蛋白设计构建的DNA片段, 插入pUC57质粒MCS区域 BamH I 酶切位点处。载体图谱如下图所示



(注: 质粒需要基因合成公司构建及合成)

2、PCR模板的获取及纯化

(1)、模板扩增:

① PCR体系配制 (25μL):

组分	用量
PCR Master Mix (2X)	12.5 μ L
PCR Primer Mix (5 μ M each)	2 μ L
Template DNA**	<100 ng
RNase-free ddH ₂ O	Up to 25 μ L

② 反应程序如下：

步骤	温度	时间	循环数
01	95°C	5 min	1×
02	95°C	15 s	40×
	58°C	15 s	
	72°C	30 s	
03	72°C	10 min	1×

(2)、PCR产物验证及纯化：通过变性凝胶电泳分析PCR产物，使用磁珠法纯化PCR产物。

转录操作步骤

Transcription procedure

1、体系配制 (50 μ l体系*)：

组分	用量
T7 Reaction Buffer (10X)	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 ug (\leq 5 μ L)

RNase-free ddH₂O

Up to 50 μ L

2、混匀后（避免剧烈涡旋），短暂离心，37°C 孵育 1-2 h***即可完成转录得到较高产量；

3、向反应产物加入40 μ l RNase-free ddH₂O稀释，并加入10 μ l DNase I Buffer（10X）和1 μ l DNase I的预混液，轻轻混匀，短暂离心后，37°C孵育1h；

4、反应产物纯化****

(1) 在上述反应产物中添加10 μ L Purification Buffer，再加入200 μ L 95%冰乙醇，-30°C放置20min，12000rpm，10min，弃上清；

(2) 加入500 μ L 75%冰乙醇，12000rpm，10min，弃上清；

(3) 重复步骤（2）；

(4) 室温放置2min，加入50-100 μ L RNase-free ddH₂O，-80°C保存。

5、反应产物通过变性凝胶电泳分析。

*大批量制备时，建议使用200-500 μ L反应体系；配制200 μ l以上时，建议用水浴锅进行加热，并每隔30min上下混匀一次；

**阳性对照加入2 μ l Positive Control；

***合成 RNA 片段较短 (< 300 nt) 时建议 37°C 孵育 4 - 16 h 或更长时间，过夜不会影响产物质量。

****若需制备更高纯度的RNA建议使用过柱纯化法。

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。

© Ezassay Biotechnology, Inc 05

核酸与蛋白产品专业提供商
Professional supplier of point-of-care test products

EZ assay 深圳易致生物科技有限公司

🌐 www.ezassay.com

✉ info@ezassay.com