



Cas12a 反应试剂盒 (试纸型)

Cas12a master mix (lateral flow)

✉ info@ezassay.com

🌐 www.ezassay.com

深圳易致生物科技有限公司

目录编号: CAS12-MIX-PS
CAS12-MIX-PS-5

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

Cas12 在向导 RNA 引导下识别并切割靶标 DNA 时，其“附属切割”活性被激活，可任意高效切割体系中 DNA。使用标记荧光基团和淬灭基团的 Reporter DNA，可实现 CRISPR/Cas12 对 DNA 模板的检测和信号放大。这一特点可被用于分子诊断领域，实现对病原体的检测。

试剂盒组成

Materials supplied

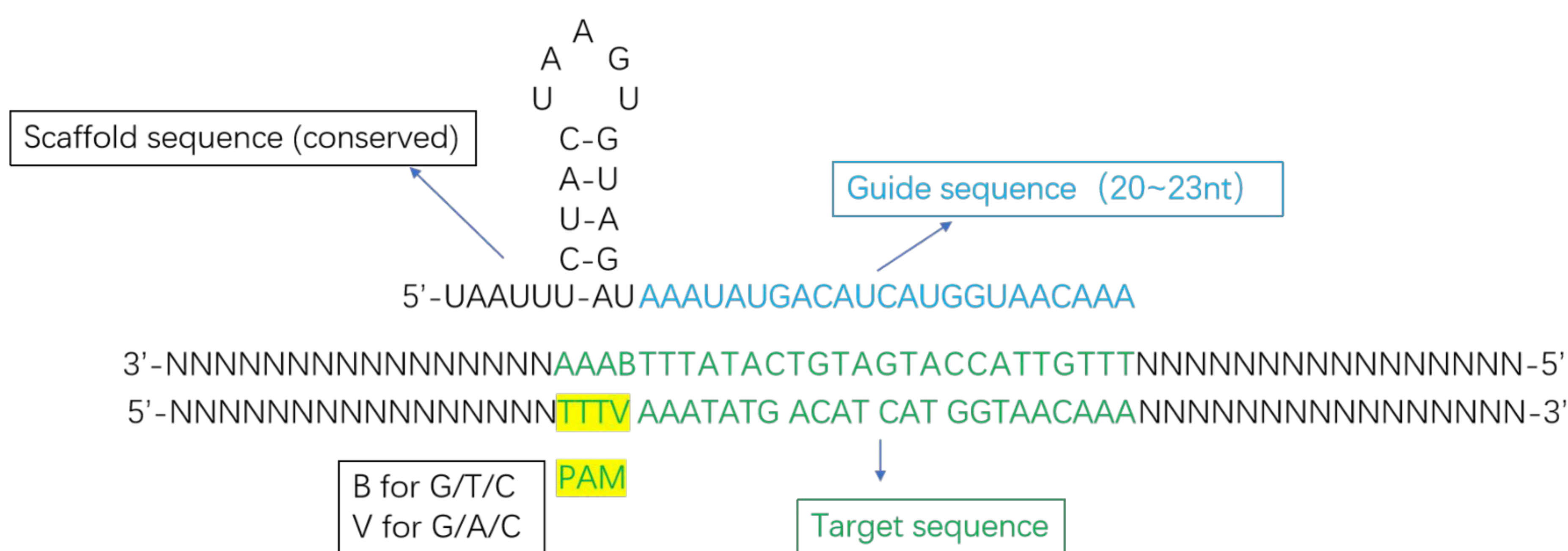
组分	CAS12-MIX-PS 96T	CAS12-MIX-PS-5 96T*5
Cas12a Reaction Buffer (10X)	240 μ l	240 μ l*5
Cas12a Protein (10 μ M)	20 μ l	20 μ l*5
Cas12a Diluent Buffer (1X)	200 μ l	200 μ l*5
Cas12a Reporter (4 μ M)	500 μ l	500 μ l*5
Positive Control (10X)	20 μ l	20 μ l*5
crRNA for Positive Control (20X)	10 μ l	10 μ l*5
Diluent Buffer	10 ml	10 ml*5

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. 恒温仪器 (例如金属浴)
3. 移液器
4. Nuclease-free water
5. crRNA/gRNA: 与Cas12a结合, 形成功能复合物, 被目标序列特异性激活。(Cas12a crRNA scaffold sequence结构序列: 5' -UAAUUUCUACUAAGUGUAGAU-3')

LbaCas12a crRNA



储存

Storage

-20°C保存, ▲避免反复冻融。建议根据实际使用量分装保存。

检测样品

Sample for detection

DNA 模板 (RNA模板需要反转录为cDNA)

检测步骤

Assay procedure

- 在冰上融化后混匀试剂。
 - 使用Cas12a检测特异性目标序列，提前打开恒温仪器，例如：金属浴或PCR仪，把反应温度设置为37°C（PCR仪需关闭热盖功能或把热盖设置为45°C，并确保热盖温度较低。）
- 以配制20 μL反应体系为例 (注意：**冰上操作**):

序号	名称	体积
01	Cas12a Reaction Buffer (10X)	2μl
02	Cas12a Protein (1μM) *	1μl
03	Cas12a Reporter (4μM) **	0.25μl
04	crRNA(1μM)	1μl
05	DNA模板 ***	x μl
06	Nuclease-free H2O	To a total volume of 20 μl

*使用Cas12a Diluent Buffer 把Cas12a protein (10μM) 稀释为Cas12a protein (1μM)

**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）

***一定浓度的DNA模板或PCR、恒温扩增产物均可（RNA模板需要反转录为cDNA），如模板浓度高推荐模板加样量为1μL，x ≤ 5μL

- 配制阳性对照组20 μ L反应体系

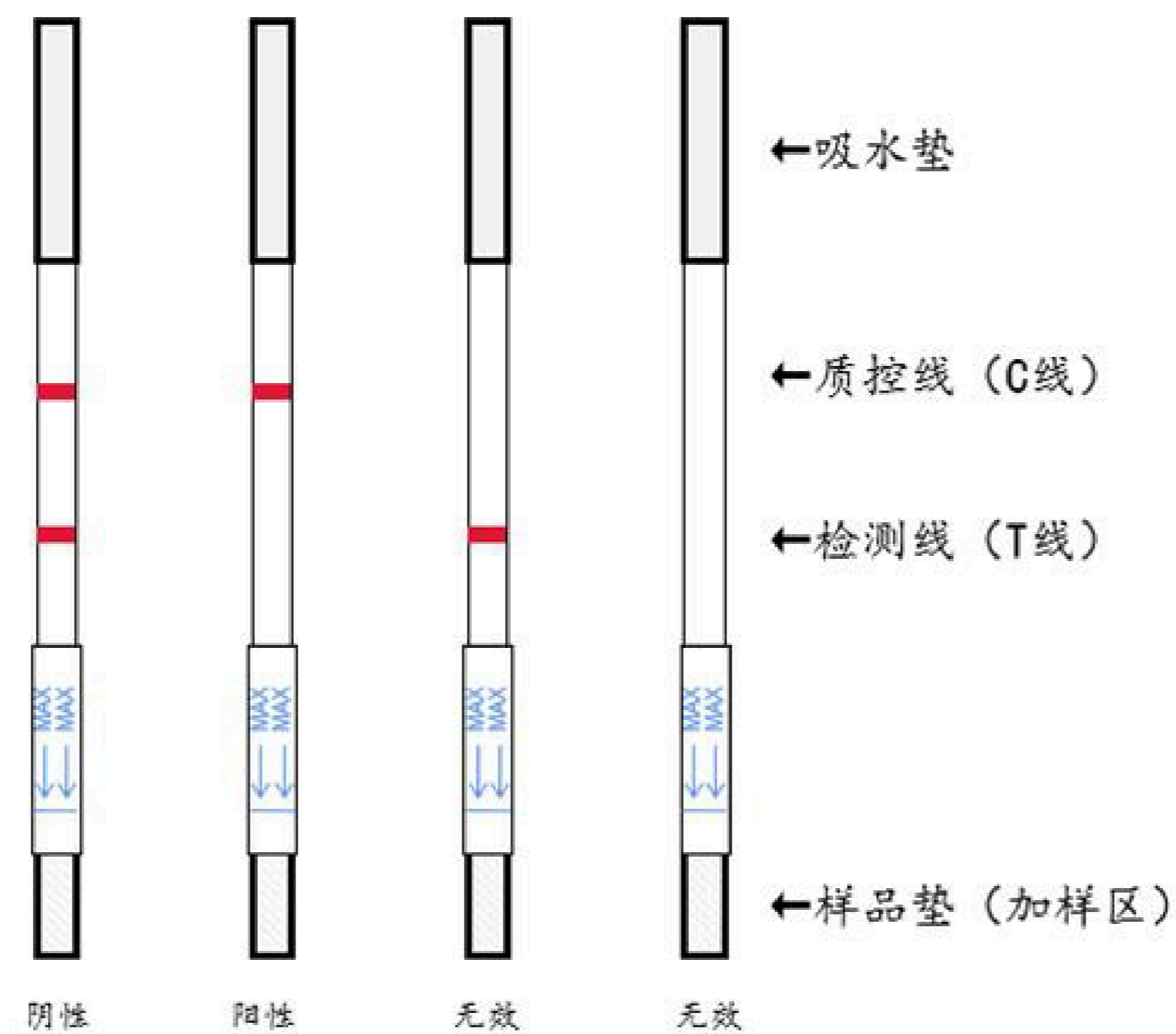
序号	名称	体积
01	Cas12a Reaction Buffer (10X)	2 μ l
02	Cas12a Protein (1 μ M) *	1 μ l
03	Cas12a Reporter (4 μ M)	0.25 μ l
04	Positive Control (10X)	2 μ l
05	crRNA for Positive Control (20X)	1 μ l
06	Nuclease-free H ₂ O	13.75 μ l

*使用Cas12a Diluent Buffer 把Cas12a protein (10 μ M) 稀释为Cas12a protein (1 μ M)

- 轻弹数次混匀，稍微离心（避免涡旋剧烈震荡），重复3次
- 将反应管放置于恒温仪器（例如金属浴），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）
- 把稀释后的反应产物全部滴于核酸检测试纸条（应缓慢滴加），5分钟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：

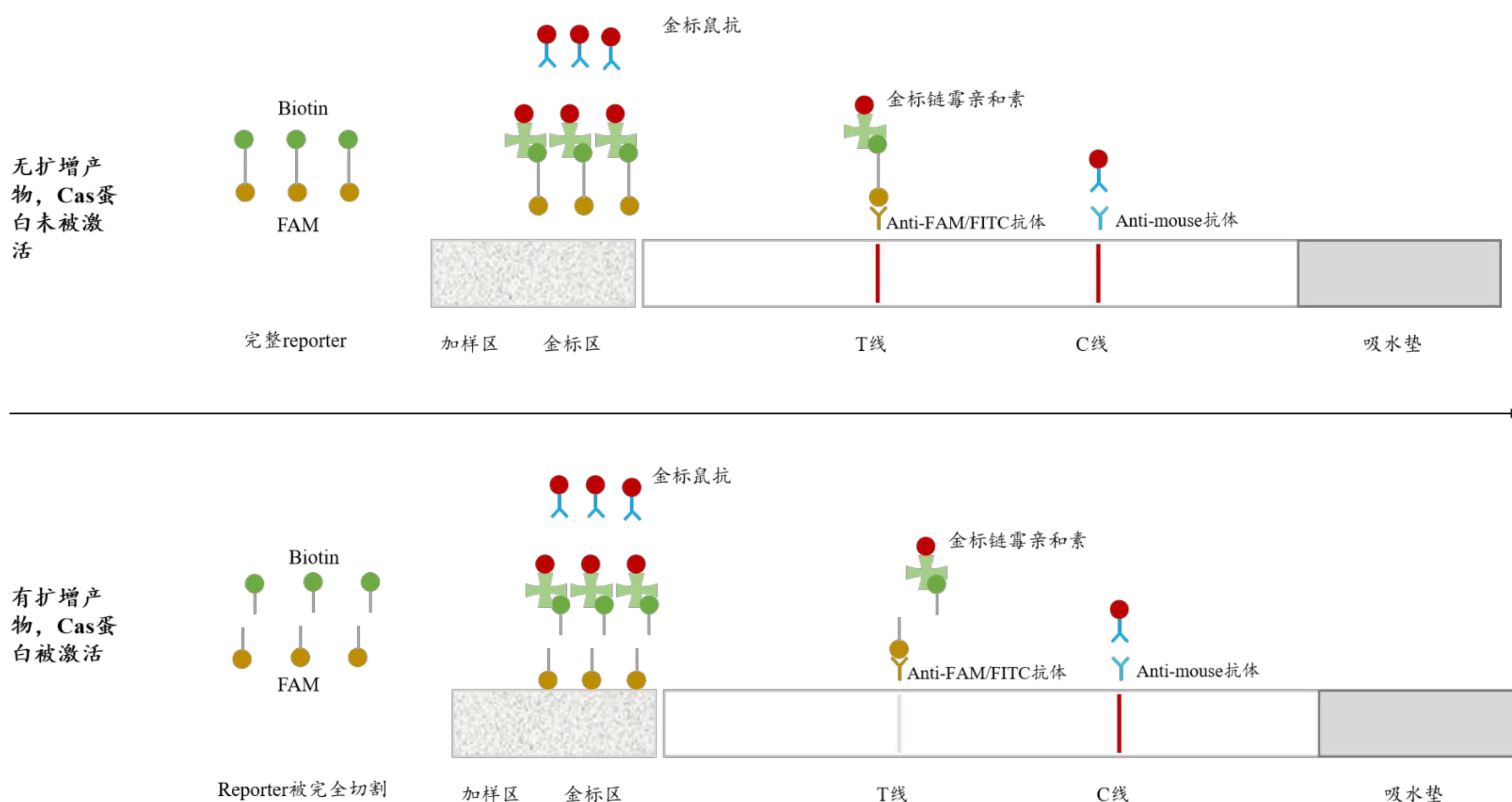
检测线(Test Line, T线)无条带，同时质控线(Control Line, C线)有条带。阳性结果表明样本中含有待检测的目的核酸片段。（Cas 蛋白酶被激活，Reporter被切割，T线不显色）

- 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)。