



Cas14a 反应试剂盒 (荧光型)

Cas14a master mix (fluor)

✉ info@ezassay.com

🌐 www.ezassay.com

深圳易致生物科技有限公司

目录编号: CAS14-MIX-FM
CAS14-MIX-FM-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	1
储存	2
操作步骤	3
注意事项	3

产品简介

Brief introduction

Cas14a，又称Un1Cas12f1，是一种内切核酸酶，其在tracrRNA:crRNA（或sgRNA）的引导下，特异结合并切割靶标ssDNA，且无需PAM位点。与Cas12类似，Cas14a也可以结合靶标核酸并激活其ssDNA反式切割活性，从而被应用于靶标核酸的分子检测；与Cas12不同的是，Cas14a只能结合ssDNA靶标，因此经过扩增富集的靶标核酸需使用T7核酸外切酶进行处理，且其中一条扩增引物需要使用磷硫酰化修饰以确保T7核酸外切酶仅切割其中一条链，从而留下ssDNA靶标链以用于Cas14a介导的分子检测。

试剂盒组成

Materials supplied

组分	CAS14-MIX-FM 96T	CAS14-MIX-FM-5 96T*5
Cas14a Reaction Buffer (10X)	240 μl	240 μl*5
Cas14a Protein (10μM)	50 μl	50 μl*5
Cas14a Reporter (10μM)	50 μl	50 μl*5
T7 Exonuclease Reaction Buffer (10x)	500μL	500μL*5
T7 Exonuclease (10U/μL)	100μL	100μL*5
Positive Control	50 μl	50 μl*5

需要但未提供的材料

Other materials required

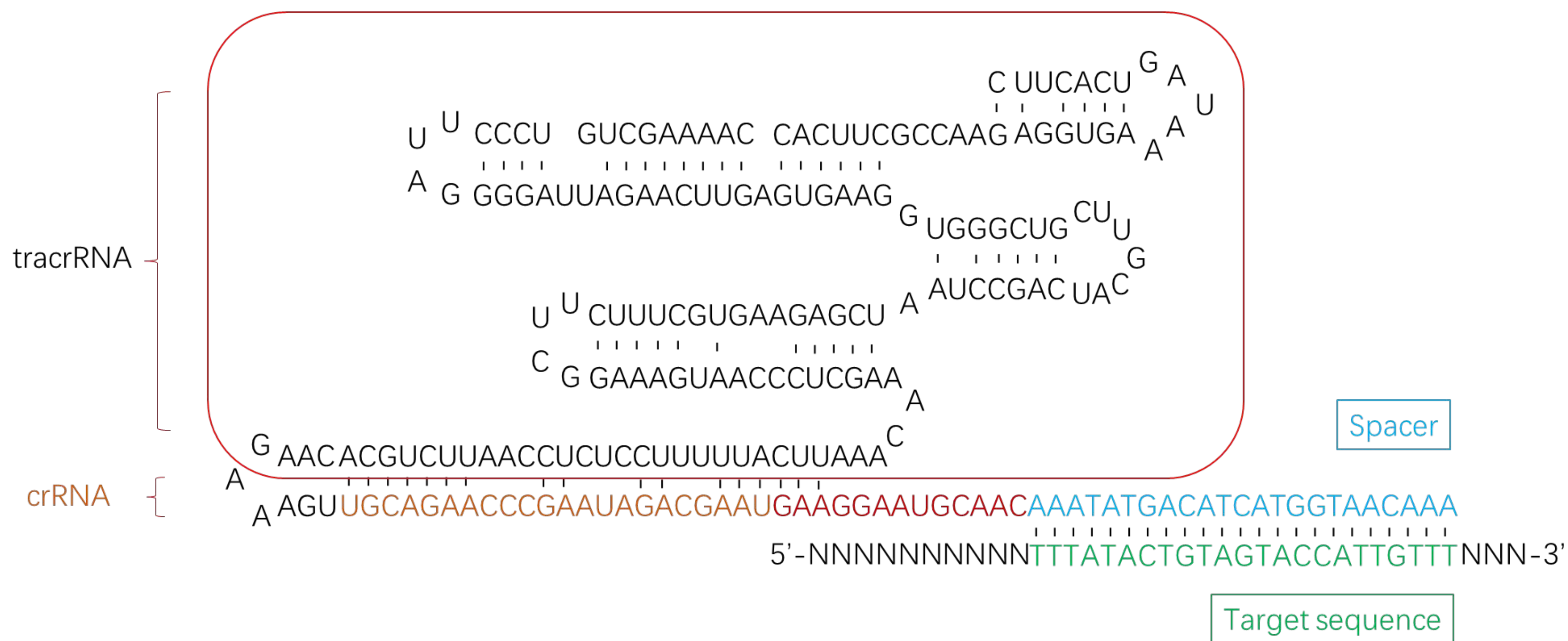
1. 荧光仪，读FAM信号（例如qPCR仪）

2. 移液器

3. Nuclease-free water

4. crRNA/gRNA：与Cas14a结合，形成功能复合物，被目标序列特异性激活。
- Cas14a sgRNA scaffold sequence结构序列: 5’ -3’ :
- CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAG
UGAAGGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAAGUAACCCUC
GAAACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAAGAAAGUUGCAGAACCCGAAUAGACGAA
UGAAGGAAUGCAAC

Cas14a(Cas12f1) sgRNA:



注意：dsDNA靶标需带有PAM位点，而ssDNA靶标不依赖PAM位点。

储存
Storage

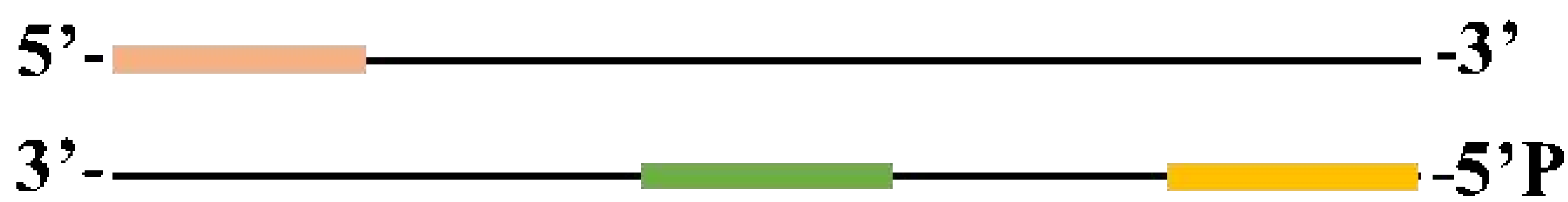
-20°C保存，▲避免反复冻融。建议根据实际使用量分装保存。

操作步骤
Operation Steps

1. 对于PCR/RPA/LAMP等扩增产物，建议首先用T7外切酶将dsDNA消化得到ssDNA。以50μl反应体积为例, 根据下表配置反应：

组份	用量	终浓度
T7 Exonuclease Reaction Buffer (10x)	5μL	1x
T7 Exonuclease (10U/μL)	1μL	-
扩增产物*	1~40μL	Up to 1μg
ddH2O	Up to 50μL	-

*其中一条引物5’ 需要磷硫酰化修饰。



引物1, 例如PCR引物F, LAMP引物F3



crRNA配对区域。注意：保留该区域，与crRNA互补配对，激活Cas14a.



引物2, 例如PCR引物R, LAMP引物B3. 注意，5'端磷酸化修饰。

引物设计示意图

2. 25°C反应30分钟。
3. Cas14a反应。以配制20 μl反应体积为例 (如果荧光仪从顶部读荧光信号，建议配制大体积，例如40μl)，根据下表配置反应：

组分	实验组	阳性对照组	阴性对照组
Cas14a Reaction Buffer (10x)	2 μL	2 μL	2 μL
Cas14a Protein (10μM)	0.5 μL	0.5 μL	0.5 μL
Cas14a Reporter (10μM) *	0.5 μL	0.5 μL	0.5 μL
Cas14a sgRNA (10μM)	0.5 μL	-	0.5 μL
上步反应产物	1~15μL	-	-
Positive Control**	-	5μL	-
dd H2O	Up to 20 μL		

*FAM和BHQ1标记。

** Positive Control包含sgRNA, ssDNA.

4. 轻弹数次混匀，稍微离心（避免涡旋剧烈震荡），重复3次；
5. 将反应管放置于荧光qPCR仪，37 °C反应30 分钟，FAM通道读取荧光值。

注意事项

Notes

1. 请注意分区操作，避免扩增产物对下次试验的污染。
2. 如果使用qPCR仪，请提前关闭热盖功能把热盖设置为42°C。
3. 如果使用ABI荧光PCR仪，将“Passive reference” & “Quencher” 设置为“None”。
4. **反应体系表格中的浓度为一般使用浓度，不同的实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： crRNA（250nM~1000nM）、reporter（250nM~1000nM）、Cas蛋白（250nM~1000nM）。**