

产品说明书

26 版

基本信息

产品编号:	PS2436
产品名称:	一步法 sgRNA 合成试剂盒

产品简介:

CRISPR/Cas9 是一种由 RNA 引导 Cas 核酸酶对特定基因进行 DNA 修饰的技术,其起源于细菌和古细菌为抵御噬菌体和外来质粒入侵而演化出的一种获得性免疫机制。在现代生物技术应用中,该系统经过人工优化,可通过设计合成的 sgRNA (SingleGuideRNA) 引导 Cas9 蛋白切割与 sgRNA 序列配对的靶 DNA 位点,造成 DNA 双链断裂。随后,细胞会启动非同源末端连接或同源重组等修复机制,往往导致基因发生移码突变、碱基替换或片段缺失,从而丧失功能。

一步法 sgRNA 合成试剂盒采用 PCR 扩增与 T7RNA 聚合酶体外转录相结合的两步法策略,可高效制备靶向特定基因的 sgRNA。该试剂盒提供的 ScaffoldTemplate —— 一条长度为 80nt 的序列,其部分区域可与用户设计的目标特异性序列重叠。经扩增后,即可生成用于转录的双链 DNA 模板。通过单管反应,在 0.5 至 4 小时内即可获得 10 - 40 μ g 具有生物学功能的 sgRNA。

产品特点:

- 1: 模板制备简捷: 利用 ScaffoldTemplate 与用户特异性序列,经退火与延伸即可快速生成转录模板,无需复杂克隆。
- 2: 产出高效稳定: 在 0.5-4 小时内,反应即可完成,稳定获得 10-40 μ g 高质量 sgRNA,可直接用于后续实验。

组分:

组分	组分名称	规格 (10T)	规格 (100T)	保存条件
组分 A	2 $\times$ Fast Taq Premix(with dye)	100 μ L	1mL	-20 $^{\circ}$ C
组分 B	Control sgRNA oligo	4 μ L	40 μ L	-20 $^{\circ}$ C
组分 C	Scaffold Template	10 μ L	100 μ L	-20 $^{\circ}$ C
组分 D	NTPs	40 μ L	400 μ L	-20 $^{\circ}$ C
组分 E	5 $\times$ reaction buffer	40 μ L	400 μ L	-20 $^{\circ}$ C
组分 F	5 $\times$ Enzyme buffer	40 μ L	400 μ L	-20 $^{\circ}$ C
组分 G	DNase I	20 μ L	200 μ L	-20 $^{\circ}$ C
组分 H	DEPC H2O	200 μ L	2mL	-20 $^{\circ}$ C

操作步骤(实验前请先阅读注意事项):

一: 上游 (Target-specificsgRNAoligo) 设计
1: 引物的 5' 端: T7 启动子序列加保护碱基 (20nt: TTCTAATACGACTCACTATA)
2: 转录起始位点: 添加 0~2 个 G, 添加 G 的个数由靶序列的 5' 端决定, T7 启动子至少需要 2 个 G 才能有效转录。(注: 若特异靶序列已经存在 2 个 G, 则不需要额外添加, 额外的 G 会降低剪切效率。)
3: 特异的 sgRNA 靶序列 (20nt): 靶 DNA 序列 PAM (NGG) 的 5' 端 20nt 碱基序列。
4: 引物的 3' 端: ScaffoldTemplate 退火序列 (14nt: GTTTTAGAGCTAGA)
示例



DNA 模板:

靶序列 PAM

┌───────────┐ ┌───┐

CGCGGGATCGAGATCGATCTCGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCG

GCCAGAACCAGAACCGGCCAGGTTAGCGTCGAGGAACTCTTTCAACTGAC

上游引物 (Target-specific sgRNA oligo):

SGF:

保护碱基 T7 启动子序列 添加的 G 靶序列 Scaffold Template 退火序列

┌───┐ ┌──────────┐ ┌───┐ ┌──────────┐ ┌──────────┐ ┌──────────┐

TTCTAATACGACTCACTATAGGTCGATCTCGATCCTCTACGCGTTTGTAGAGCTAGA

下游引物 SGR (已提供)

二: sgRNA 的模板扩增与回收

1: 按下列体系配置 20 μ L 反应体系:

组分	体积	终浓度
2 $\times$ FastTaq Premix (with dye)	10 μ L	1X
sgRNA oligo (10 μ M) 对应 SGF	1 μ L	0.5 μ M
Scaffold Template 对应 SGR	1 μ L	0.5 μ M
DEPC H ₂ O	7 μ L	—

2: 参考 PCR 反应程序:

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95 $^{\circ}$ C	5min	—
变性	95 $^{\circ}$ C	10s	—
退火	60 $^{\circ}$ C	15s	—
延伸	72 $^{\circ}$ C	10s	—
循环	—	—	40
最终延伸	72 $^{\circ}$ C	5min	—
保存	4 $^{\circ}$ C	Hold	—

3: 电泳检测: 使用 2%琼脂糖胶, 将多个 20 μ L PCR 反应液点入胶孔电泳检测条带大小及亮度并回收, 用 2000bp DNAMarker 标定, 其大小为 120bp 左右单一条带。

4: 小片段胶回收。

三: sgRNA 合成与回收

1: 按下列体系配置 20 μ L 反应体系:

组分	体积	终浓度
5 $\times$ reaction buffer	4 μ L	1X
25 mM NTPs	4 μ L	5mM
5 $\times$ Enzyme buffer	4 μ L	1X
Template DNA (100ng/ μ L)	3 μ L	—
DEPC H ₂ O	5 μ L	—





A:低温配置可能引起 DNA 模板沉淀。	
B:使用试剂、容器等无 RNase 污染。	
温度	时间
37℃	4h
4℃	∞
注意：反应于 PCR 仪中进行，热盖打开，防止长时间导致反应液蒸发。	
反应结束加入 30 μ L DEPC H2O，再加入 2 μ L DNase I，37℃，15min（反应需要不加酶作为阴性对照）。	

2: 电泳检测

使用 1%琼脂糖胶，取 2 μ L 产物加 3 μ LDEPC

H2O 再加 1 μ L6×DNAloading，冰浴跑胶，100V，30min（用 2000bpDNAMarker 标定）。

3: 转录产物纯化（选择普西唐 PS0808Trizol）

A: 将转录产物转移至 RNase-free 的 1.5mL 离心管中，每个离心管当中加入 1mLTrziol，冰上静置 5min，加入 1/5 体积的氯仿，剧烈震荡 15s，4℃静置 5min。

B: 12000rpm，4℃离心 15min。

C: 小心移取上清无色水相到新的 RNase-free 的 1.5mL 离心管中，加入等体积遇冷的异丙醇，上下颠倒混匀，4℃静置 10min。

D: 12000rpm，4℃离心 10min，小心弃去上清，加入 1mL75%乙醇（DEPCH2O 配置）。轻弹管底，让沉淀悬浮，并上下颠倒数次，室温静置 3min。

E: 12000rpm，4℃离心 5min，弃掉多余上清后，短暂离心用移液枪，吸取剩余上清。

F: 敞口干燥 5min，但要注意不可过度干燥，加入 50 μ LDEPCH2O 必要时用移液枪轻轻吹打溶解。

G: 测浓度，OD260/OD280 比值在 1.8-2.2 之间纯度较高。

4: 所设计的 sgRNA 的效果鉴定（选做）

1: 参考下表在冰上配制如下反应体系 Cas9 Nuclease(普西唐有售)

Reagent	Sample	PositiveControl
CandidatesgRNA(100ng)	X μ L	—
PositiveControlsgRNA(50ng/ μ L)	—	2 μ L
Cas9Nuclease(1 μ g/ μ L)	2 μ L	2 μ L
10XReactionBuffer	2 μ L	2 μ L
DEPCWater	(12-x) μ L	12 μ L
Mixwellandincubateat25° Cfor10min		
TargetDNA(160ng)	Y μ L (0≤y≤2)	—
PositiveControlDNA(80ng/ μ L)	—	2 μ L
DEPCWater	(2-y) μ L	—
TotalVolume	20 μ L	20 μ L

2: 用移液器轻轻吹打混匀，37℃ 孵育 15 分钟进行切割反应。也可适当延长反应时间至 30 分钟，通常反应 30 分钟就可获得较好切割效果，无需进一步延长反应时间。

3: 终止反应。加入 0.5 μ LProteinaseK，混匀，室温孵育 10 分钟。

4: 电泳检测。加入 3 μ LDNA 上样缓冲液(6X)（PC0810），取出 10–15 μ L 反应产物，进行 1-2%琼脂糖凝胶电泳，同时取约 50ng 未被切割的底物 DNA 作为阴性对照。电泳结束后使用凝胶成像系统观察实验结果。





Beijing Psaitong
Biotechnology Co., Ltd

注意事项:

- | |
|---|
| 1: 本产品使用时会涉及 gRNA 和 DNA 的操作, 必须注意 RNase-free 和 DNase-free 的相关操作。所有自行准备的试剂和耗材也都应是 Nuclease-free 的。如果可能有核酸酶污染, 可考虑用 0.01% 的 DEPC 处理过夜, 然后高温高压处理后使用。 |
| 2: 为了您的安全和健康, 实验时请穿实验服并戴一次性手套操作。 |

储存: 低温运输, -20℃ 保存, 24 个月。

*更多产品请登陆官网查询。
*本公司产品仅用于科研。

真实 准确 稳定 负责

010-60605840
www.jm-bio.com
psaitong@jm-bio.com

