

产品说明书

26 版

基本信息

产品编号:	PS2437
产品名称:	sgRNA 体外筛选试剂盒

产品简介:

本产品是一款基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的体外检测工具。它通过模拟 Cas9 核酸酶在 sgRNA 引导下对靶 DNA 的切割过程, 为用户提供一种简单、可靠、快速的方法, 在进入细胞实验前即可评估并筛选出高效率的 sgRNA, 从而显著节省研究时间和成本。

产品特点:

- 1: 体外预筛, 高效省时: 无需进行复杂的细胞转染和培养, 在试管中即可快速评估 sgRNA 的切割效率。
- 2: 操作简便, 流程优化: 试剂盒提供经过优化的反应体系和高活性 Cas9 核酸酶, 用户只需准备 sgRNA 和靶 DNA 模板; 后续通过常规的琼脂糖凝胶电泳即可分析结果, 方法简单, 易于判读, 无需特殊设备。

组分:

组分	组分名称	规格 (10T)	规格 (100T)	保存条件
组分 A	Cas9 Nuclease (1 μ g/ μ L)	20 μ L	200 μ L	-20 $^{\circ}$ C
组分 B	10 $\times$ reaction buffer	20 μ L	200 μ L	-20 $^{\circ}$ C
组分 C	Positive Control sgRNA (50 ng/ μ L)	4 μ L	40 μ L	-20 $^{\circ}$ C
组分 D	Positive Control DNA (80 ng/ μ L)	4 μ L	40 μ L	-20 $^{\circ}$ C
组分 E	Proteinase K	5 μ L	50 μ L	-20 $^{\circ}$ C
组分 F	DEPC H ₂ O	100 μ L	1mL	-20 $^{\circ}$ C

操作步骤(实验前请先阅读注意事项):

一: 制备靶 DNA 片段。

1: 引物设计。设计引物扩增 Cas9/sgrNA 复合物靶向的基因组 DNA 区域。引物长度通常宜在 18-22bp 左右, GC 含量宜在 45%-60%之间, $T_m > 55^{\circ}$ C, 引物扩增的片段长度宜在 2000bp 以下, 且 sgrNA 靶向序列不宜处于扩增片段正中央。Cas9/sgrNA 复合物切割后宜形成两个大小相差至少 100bp 的片段, 以便于进行后续的电泳分析鉴定。

2: PCR 扩增完成以后, 扩增模板可以是线性化的质粒、PCR 产物或合成的寡核苷酸。PCR 扩增产物即为体外筛选实验中的 Cas9/sgrNA 复合物的切割底物。

3: PCR 结束后, 如果扩增产物含有非特异性条带则需将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 并回收目的条带, 推荐使用多功能 DNA 纯化回收试剂盒 DNA 凝胶回收。注: 请确认回收的切割底物 DNA 无乙醇残余或其它污染。

二: 所设计的 sgRNA 的效果鉴定

1: 参考下表在冰上配制如下反应体系:

Reagent	Sample	Positive Control
Candidate sgRNA (100 ng)	X μ L	—
Positive Control sgRNA (50ng/ μ L)	—	2 μ L
Cas9 Nuclease (1 μ g/ μ L)	2 μ L	2 μ L





10X Reaction Buffer	2 μL	2 μL
DEPC Water	(12-x) μL	122 μL
Mix well and incubate at 25° C for 10min		
Target DNA (160 ng)	Y μL (0≤y≤2)	—
Positive Control DNA (80ng/μL)	—	2 μL
DEPC Water	(2-y) μL	—
Total Volume	20 μL	20 μL

2: 用移液器轻轻吹打混匀, 37°C 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 μL ProteinaseK, 混匀, 室温孵育 10 分钟。

4: 电泳检测。加入 3 μL DNA 上样缓冲液 (6X), 取出 10-15 μL 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。

三: sgRNA 靶向效率计算。

使用凝胶图像分析软件确定每个条带的灰度值, 评估各个 sgRNA 的靶向基因编辑效率, 挑选效率较高的一个或多个 sgRNA 进行后续实验。sgRNA 靶向效率的计算公式如下:

$$\% \text{indel} = \left(1 - \sqrt{1 - (a+b)/(a+b+c)} \right) \times 100$$

a, b 为被切割产生的两个小条带 (Cut) 的灰度值; c 为未被切割条带 (Uncut) 的灰度值。按照此方法计算的靶向基因编辑效率可作

为体外研究的评估参考, 与实际体内基因编辑研究中的编辑效率不完全相同但通常会基本一致。

注意事项:

1: 本试剂盒提供的 Positive Control DNA 大小约为 1672bp, 经过 Positive Control sgRNA 反应后的切割条带分别约为 506bp 和 1166bp。

2: 酶使用时宜存放在冰盒内或冰浴上, 使用完毕后宜立即放置于 -20°C 保存。

3: 严格使用 RNase Free 的实验器材 (如吸头、离心管、PCR 管等), 并在操作过程中严格注意避免 RNase 污染

4: 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°C 保存, 24 个月。

