

PC1380











sgRNA 体外转录试剂盒 (V1.3)

*更详细的说明书可以从微信公众号下载。

产品简介: sgRNA 体外转录试剂盒采用 T7 RNA 聚合酶复合物高效转录 spCas9sgRNA。试剂盒中的反应体系根据 sgRNA 特点进行优化, 每个反应可在 4 小时内获得多达 100-200µg 的 sgRNA。sgRNA 可直接用 Cas9 蛋白体外切割, 纯化后可用于细胞注射等实验。

试剂盒中配备了合成 sgRNA 转录模板, sgRNA 转录所需的全部试剂, 用户仅需要合成含有 1 条 CRISPR 靶点的引物就能完成 sgRNA 体外转录。

产品内容:

	PC1380-10	PC1380-50
 T7 Transcription Enzyme Mix	20 µl	100 µl
 5× Transcription Buffer	40 µl	200 µl
 NTP, 25 mM each	80 µl	400 µl
 Positive control Primer (10 µM)	10 µl	25 µl
 SG-R primer(10 µM)	20µl	100µl
 PCR template(10 ng/µl)	15µl	75µl
 2× PCR Mix	120µl	600µl
 RNase free H ₂ O	1 ml	1 ml

2×RNA Loading Buffer

50 µl

250 µl

储存条件: -20℃冻存

使用前必读注意事项:

! 务必使用无 RNA 酶的枪头、离心管配制转录反应体系。

1、制备转录模板

1.1 设计 PCR 正向引物:

spCas9 识别的靶点为 20nt+NGG 共 23 个碱基序列, 我们以阳性对照的靶点序列为例说明设计引物的方法。

阳性对照的靶点序列为:

5'**CTGCTAATCCTGTTACCAAG**TGG-3'

需要合成的正向引物序列为:

5'-

TTAATACGACTCACTATAGGG**CTGCTAATCCTGTTACCAAG**GTTTTAGAGCTAGAAATA -3'

1.2 PCR 扩增转录模板

反应体系:

正向引物 (10 µM)	0.8µl
SG-R primer	0.8µl
PCR template	0.5 µl
2× PCR Mix	10µl
H ₂ O	7.9µl

阳性对照反应:

Positive control Primer (10 µM)	0.8µl
SG-R primer	0.8µl
PCR template	0.5 µl
2× PCR Mix	10µl
H ₂ O	7.9µl

反应条件:

95°C 5min

95°C 30sec

56°C 30sec

72°C 30sec

} 35 cycles

扩增产物为 117bp。扩增完成后用 2%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

2、sgRNA 转录

操作过程中采用无 RNA 酶的吸头及离心管操作，并注意避免 RNA 酶污染。

2.1 转录反应

按顺序加入以下反应物:

(1) 反应体系:

无 RNA 酶水	to 20 μ l
5 \times Transcription Buffer	4 μ l
NTP mix	8 μ l
PCR 产物	2 μ l
T7 Transcription Enzyme mix	2 μ l

*20ul 体系 sgRNA 产量为 100-200ug。如果下游实验所需 sgRNA 量较少，可以根据需要适当调整体系，但尽量不低于 5ul。

(2) 转录条件: 充分混匀, 37°C 孵育 4 小时。

*孵育时尽量采用 PCR 仪等带有热盖的仪器，或者在 37°C 恒温培养箱反应。切勿使用水浴锅。

(3) 转录完成后取少量反应液，稀释 20 倍后用琼脂糖凝胶电泳检测产物大小及完整性。

转录产物全长序列:

5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAATGCAAGTTAAAAT
AAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCT-3'

电泳方法:

- (1) 取 1 μ l 转录产物，加入 19 μ l 无 RNA 酶水，混匀（稀释 20 倍）。
- (2) 取 3 μ l 稀释后样品，加入 3 μ l 2 \times RNALoading Buffer。70°C 加热 10min，立即放置冰上。
- (3) 用 2%琼脂糖凝胶电泳检测条带。

3、转录产物纯化

- * 转录产物可以直接用于 Cas9 体外酶切反应。纯化步骤选做。
- * 转录模板 DNA 对 Cas9 体外酶切没有影响，可以不用去除。如果要去除模板 DNA，可以先用 DNase I 消化转录反应液，再进行纯化。
- * 可以选用可靠公司生产的 RNA 纯化试剂盒进行纯化或者乙醇沉淀纯化。乙醇沉淀纯化方法见电子版说明书。

4、RNA 定量

转录得到的 sgRNA 可以采用紫外分光光度计定量。一般 20 μ l 体系可以得到 sgRNA 100~200 μ g

关注微信公众号，下载电子版说明书:



相关产品:

Cas9 体外酶切试剂盒货号: PC1400

Cas9-NLS 蛋白货号: PC1350

spCas9 SpRY 突变体体外酶切试剂盒:PC1401

023-67630383

order@inovogen.com

www.inovogen.com