

**saCas9-gRNA 靶点效率检测试剂盒(Catalog. No. VK012)**

## 产品组成

	组成	货号	编号	VK012-10T	VK012-30T
saCas9 酶切试剂	saCas9 (1U/ $\mu$ L)	VK012-10	1#	12 $\mu$ L	34 $\mu$ L
	10 $\times$ saCas9 buffer	VK012-11	2#	50 $\mu$ L	200 $\mu$ L
体外转录试剂	T7 RNA Polymerase Mix (5U/ $\mu$ L)	VK010-01	3#	22 $\mu$ L	62 $\mu$ L
	rNTP (100 mM,rATP/rUTP/rCTP/rGTP)	VK010-02	4#	24 $\mu$ L	64 $\mu$ L
	10 $\times$ Transcription Buffer	VK010-03	5#	24 $\mu$ L	64 $\mu$ L
	Stop Solution	VK010-04	6#	200 $\mu$ L	500 $\mu$ L
	DNaseI (1U/ $\mu$ L)	VK010-05	7#	24 $\mu$ L	64 $\mu$ L
标准 gRNA 试剂	标准 gRNA 模板(50ng/ $\mu$ L)	VK012-12	8#	20 $\mu$ L	60 $\mu$ L
	标准 gRNA1(g1)引物 g1-FP(10 $\mu$ M)	VK012-13	9#	10 $\mu$ L	30 $\mu$ L
	标准 gRNA2(g2)引物 g2-FP(10 $\mu$ M)	VK012-14	10#	10 $\mu$ L	30 $\mu$ L
	反向引物 gRNA-RP(10 $\mu$ M)	VK012-15	11#	30 $\mu$ L	100 $\mu$ L
	DEPC H <sub>2</sub> O	VK010-06	12#	1mL	1mL

注意：收到试剂盒后，使用前请离心，避免试剂滞留在离心管盖上。

保存条件：请将产品于-20 $^{\circ}$ C保存，避免反复冻融

## 原理：

CRISPR/Cas9 是细菌和古细菌在长期演化过程中形成的一种适应性免疫防御，可特异剪切外源的病毒及 DNA 以对抗入侵。人工改造过的 Cas9/gRNA 系统通过 gRNA (short guide RNA) 引导 Cas9 蛋白识别并剪切带有 gRNA 靶点的双链 DNA，用于基因敲除和精确编辑 DNA 等操作。利用 CRISPR 技术进行基因敲除和编辑操作实验前，获得剪切活性高的 gRNA 靶点是实验成功的关键。

Cas9/gRNA 剪切活性与 gRNA 靶点的识别序列有关，每个 gRNA 的剪切活性都会不同。

本试剂盒通过 saCas9/gRNA 体外酶切靶点 DNA 片段，进行 gRNA 靶点活性的评估。体外 saCas9 酶切 DNA 效果与 DNA 浓度、saCas9 酶量、反应时间、gRNA 的量、靶点活性有关，为了科学地评价 gRNA 靶点效率，将固定 DNA 浓度和 saCas9 酶量，在一定单位时间内，测量 saCas9 酶切靶点 DNA 的效率，并通过与已知有活性的 gRNA 靶点进行比较，评价目标 gRNA 靶点的活性。

**实验材料:**

1. 带有 gRNA 靶点的质粒或 PCR DNA 片段（客户准备，制备方法参考附件）
2. 体外转录的靶点 gRNA
3. saCas9 酶和 10×Cas9 Buffer

**实验步骤:**

**1. 体外转录 gRNA**

一)、gRNA PCR 产物的获得

分两种情况:

I: 若客户已经设计了 gRNA 靶点，未构建到 gRNA 表达载体上。可以先检测 gRNA 的靶点活性，再把有活性的 gRNA 靶点构建到 gRNA 表达载体或者使用下面体外转录的 gRNA 进行显微注射。

A、引物合成:

请合成引物 T7-gRNA-FPg:

T7-gRNA-FPg	TAATACGACTCACTATAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGT TTTAGTACTCTGGAAACAG
gRNA-RP (VK012-15)	ATCTCGCCAACAAGTTGACGAG

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 是 gRNA 靶点（注意不带 PAM 序列）

B、PCR 扩增反应:

使用 T7-gRNA-FPg（客户自己合成，浓度稀释为 10μM）和 gRNA-RP（VK012-15）引物对，以标准 gRNA 模板（VK012-12）为模板做 PCR（PCR 产物 120bp 左右），对于每个样品请按如下 50μL 体系扩增 2 管。

PCR 体系如下（PCR 酶推荐使用保真性较好的 DNA 聚合酶 Pfu，请另行购买，如唯尚立德的 solidPfu Mix 试剂盒(Cat. No.VK008)）:

组分	用量
标准 gRNA 模板（VK012-12, 50ng/μL）	0.5μL
T7-gRNA-FPg（10μM）	1.5μL
gRNA-RP（VK012-15, 10μM）	1.5μL
2×Pfu Mix	25 μL
DEPC H <sub>2</sub> O（VK010-06）	21.5μL
Total	50μL

PCR 程序如下:

95°C	3 min	
94°C	30 sec	} 35 Cycles
58°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	10 min	
16°C	10 min	

C、PCR 产物的检测和回收:

同一样品的 2 管 PCR 产物混合到一管后取 3 $\mu$ L 跑 1.3% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果 (大小应为 120bp 左右的单一条带);

检测正确后使用 PCR 产物纯化试剂盒 (如全式金的 EP101-01) 进行过柱纯化操作, 最后使用 40 $\mu$ L DEPC H<sub>2</sub>O 洗脱 DNA, 测浓度 (至少要 $\geq$ 70ng/ $\mu$ L, 若浓度太低请浓缩处理或重新扩增 3~4 管 50 $\mu$ L 体系 PCR 产物), 作为后续体外转录的 DNA 模板。

※请同时准备标准 gRNA1(g1)和标准 gRNA2(g2)的 PCR 产物:

使用标准 gRNA1(g1)引物 g1-FP (VK012-13, 10 $\mu$ M) 或者标准 gRNA2(g2)引物 g2-FP (VK012-14, 10 $\mu$ M) 和 gRNA-RP (VK012-15, 10 $\mu$ M) 引物对, 以标准 gRNA 模板 (VK012-12) 为模板做 PCR, PCR 反应体系、反应程序、检测、回收及后期处理均参考上面所示。

II. 若客户已经将 gRNA 靶点构建到 gRNA 表达质粒上, 需要检测 gRNA 的靶点活性。

A:、引物设计:

请合成引物 T7-gRNA-FP:

T7-gRNA-FP	TAATACGACTCACTATAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
gRNA-RP (VK012-15)	ATCTCGCCAACAAGTTGACGAG

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 是 gRNA 靶点 (不带 PAM 序列)

B、PCR 扩增:

使用 T7-gRNA-FP (客户自己合成, 浓度稀释为 10 $\mu$ M) 和 gRNA-RP (VK012-15) 引物对, 以带有 gRNA 靶点的 gRNA 表达质粒 (使用唯尚立德 saCas9 CRSIPR 质粒构建试剂盒系列构建) 为模板做 PCR, PCR 反应体系、反应程序、检测、回收及后

## 北京唯尚立德生物科技有限公司

期处理均参考上面所示。

二) gRNA 的转录步骤 (注意使用 RNase free 的枪头及 EP 管):

注: 1、不要使用加帽体外转录试剂盒进行 gRNA 的体外转录。

2、以下的操作请全部购买和使用 RNase free 的枪头及 EP 管, ddH<sub>2</sub>O 用 DECP 处理。

3、因 gRNA 为小片段 RNA, 不要使用 LiCl 法沉淀 RNA。

请同时准备标准 gRNA1(g1)和标准 gRNA2(g2)的体外转录。

反应体系如下:

组分	用量
10×Transcription Buffer (VK010-03)	2μL
rNTP (VK010-02)	2μL
T7 RNA Polymerase Mix (VK010-01)	2μL
gRNA PCR 产物 (上一步产物)	1μg (≤14μL)
DEPC H <sub>2</sub> O (VK010-06)	up to 20μL

以上混合后, 37°C 反应 2 小时 (推荐使用 37°C 恒温培养箱处理, 尽量不要使用水浴)。反应结束后, 加入 2μL DNase I (VK010-05), 37°C 反应 30 分钟。

三) gRNA 的回收与提取:

1) 加入 115μL DEPC 水 (VK010-06)、15μL Stop Solution (VK010-04) 混匀后, 加入 2 倍体积 (即 300μL) 的无水乙醇 (自备, 注意无 RNase 污染), 充分混匀后, -20°C 冻存 3 小时以上 (一般过夜处理)。

2) 13000rpm 4°C 离心 20 min, 去除上清保留沉淀。

3) 加入 300μL 的 70% 冷乙醇清洗 (自备, 注意用 DEPC 水配制), 13000rpm 4°C 离心 15 min, 去除上清保留沉淀, 再 13000rpm 4°C 离心 1 min, 小心吸净残留的液体, 室温晾置 1~2min 后, 加入 40μL DEPC 水溶解 RNA 沉淀。

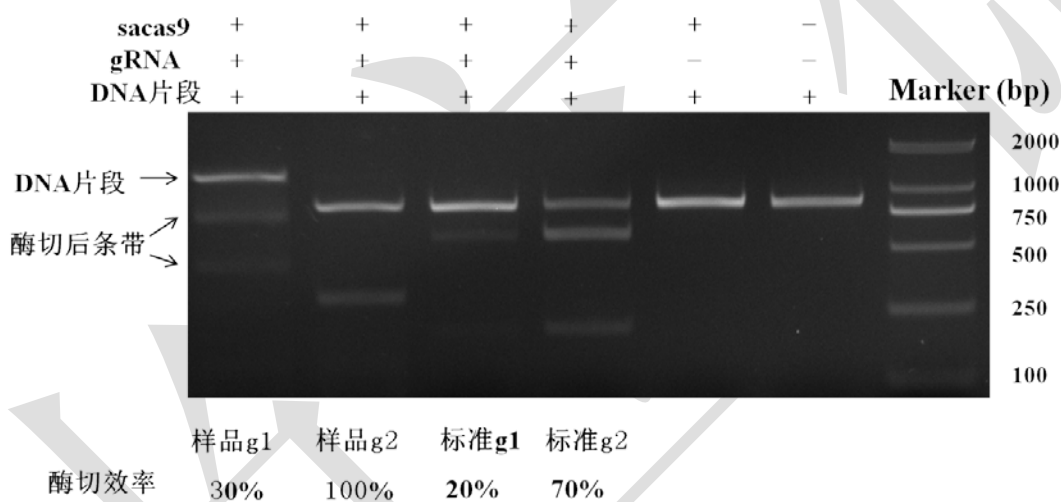
4) 测量 RNA 浓度 (一般在 500~1000 ng/μL, 若浓度过高, 请取 1μL 进行琼脂糖凝胶电泳检测, 来判断条带亮度是否和所测浓度相符), 确定浓度正确后可直接用于后续的 saCas9/gRNA 酶切实验, 或者 -80°C 保存待用。

## 2. saCas9/gRNA 体外酶切反应

按照如下反应体系次序加样, 准备酶切反应: 建议每次酶切反应, 同时做标准靶点的 gRNA 酶切反应, 做为阳性参照进行活性比对。

	1	2	3
saCas9	1μL	1μL	1μL
10× saCas9 buffer	2μL	2μL	2μL
gRNA (体外转录)	50 ng (样品 gRNA)	50 ng (标准 gRNA1(g1))	50 ng (标准 gRNA2(g2))
ddH2O	X μL	X μL	X μL
酶切的 dsDNA	50 ng (客户准备)	1μL (VK012-12, 50ng/μL)	1μL (VK012-12, 50ng/μL)
Total	20μL	20μL	20μL
充分混合后, 37°C 反应 30min, 加入 3μL DNA Loading Buffer (自备) 混合后 65°C 煮 5min, 跑 2% 琼脂糖凝胶电泳检测分析酶切结果			

琼脂糖凝胶电泳检测分析酶切结果, 对比与两个对照 gRNA 估算活性。



### 样品 gRNA 靶点评价说明:

若样品 gRNA 的酶切效率 < 标准 gRNA1(g1), 表明样品 gRNA 靶点活性比较差, 不建议使用;

若 40%-50% ≥ 样品 gRNA 的酶切效率 ≥ 标准 gRNA1(g1), 表明样品 gRNA 靶点活性合格;

若标准 gRNA 2(g2) ≥ 样品 gRNA 的酶切效率 ≥ 40%-50%, 表明样品 gRNA 靶点活性良好, 建议使用

若样品 gRNA 的酶切效率 ≥ 标准 gRNA2(g2), 表明样品 gRNA 靶点活性非常高, 建议使用。

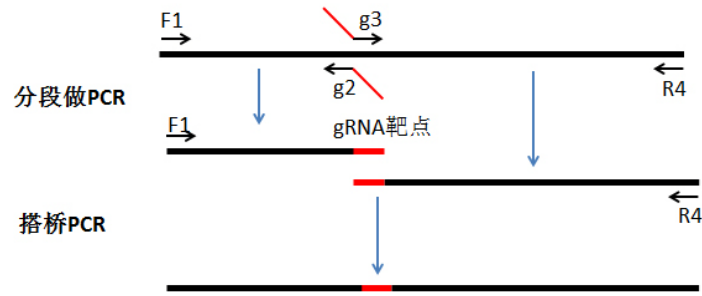
### 附件:

#### 一. 酶切 DNA 的准备:

两种方法准备酶切用的 DNA

1. 以目标基因的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增出带有 gRNA 靶点的 DNA 片段;
2. 将 gRNA 靶点 (包括 PAM 序列) 可通过搭桥 PCR 的方式构建到 PCR 产物中。如下图 所示

北京唯尚立德生物科技有限公司



建议 gRNA 靶点不要位于 PCR 片段中央，这样将切割出两条大小不同带便于判断。