

一步法 sgRNA 合成试剂盒
One-Step sgRNA Synthesis Kit

Cat. No.: D0601 25T Store at: -20℃



描述: CRISPR/Cas9 是一种由 RNA 指导 Cas 核酸酶对靶向基因进行特定 DNA 修饰的技术，也是细菌和古细菌为应对噬菌体和外源质粒的攻击而演化来的一种获得性免疫防御机制。此系统的工作原理是通过人工优化的具有引导作用的 sgRNA(Single Guide RNA)引导核酸酶 Cas9 蛋白在与 sgRNA 配对的靶位点处剪切双链 DNA，引起 DNA 断裂，进而利用生物体内非同源末端修复机制或同源重组机制修复 DNA，导致基因移码突变、替换或删除，致使基因功能丧失。

sgRNA 的体外合成通常有两种策略：一种为构建含特异性序列的转录质粒，另一种则使用合成的 oligo 退火延伸生成含 T7 转录启动子的双链 DNA 分子，进而再使用 T7 RNA 聚合酶进行体外转录，从而获得 sgRNA。利用合成的 Oligo 直接制备 sgRNA，具有操作简单快速、可实现高通量等优势，已经成为体外合成 sgRNA 的首选方案。Cas9 的切割是通过向导 RNA(gRNA)与靶 DNA 形成约 20bp 碱基的配对，且靶序列的 3'端需要有 PAM 结构(NGG)，再引导 Cas9 作用实现的。本试剂盒可通过一步反应获得高纯度、高产量的 sgRNA，仅需要合成一条含有特定靶标序列的 Oligo，可最短在 4h 内获得 50~80μg 的 sgRNA。

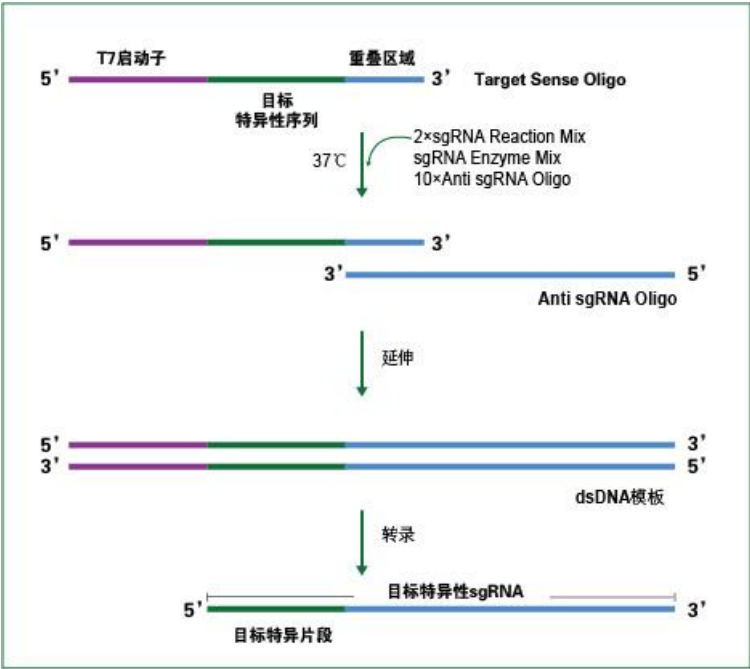
组分

名称	25T
2×sgRNA Reaction Mix	250 μl
sgRNA Enzyme Mix	50 μl
Anti-sgRNA Oligo (5μM)	50 μl
RNase Free DNase I(2U/μl)	50 μl
Positive Sense-sgRNA Oligo(5μM)	20 μl
10xRD Buffer	100 μl
RNase Free H ₂ O	1 ml

注意: Positive Sense sgRNA Oligo 为阳性对照品，在实验时可用于质控反应体系。

保存: -20℃可保存 2 年，避免反复冻融。

原理



操作步骤:

1. 如何设计靶基因的 Sense sgRNA Oligo

1.1 根据目标基因组序列选取靶 sgRNA 位点, 如下例, 红色标识靶位点, 黄色标识 PAM 序列(NGG)

5'- CTC AGT ATG ATG CTT CTG AGC TGA AAG CGT CCA TGA AGG GGC TGG GGA CTG ATG AGG ACT
 CTC TCA TTG AGA TTC TGC TCA AGG ACC AAC CAG GAG CTG CAG GAA ATC AAC AGA GTC TAC
 AAG GAA ATG TAC AAG ACC GAT CTG GAG AAG GAC A **TG CAA CCT TCA TTT CCC TGC** **TGG** TCG
 TTT CCG ACA CCT GGC CAC CTG GAG ACA GTG ATT TGG GCC TAT TGA AAA CAC CTG -3'

1.2 根据以上靶点选取的情况, 预期获得的 sgRNA 序列如下:

5'- **UGC AAC CUU CAU UUC CCU GC** G UUU UAG AGC UAG AAA UAG CAA GUU AAA AUA AGG CUA GUC
方框 sgRNA区域 **下划线crRNA区域**
CGU UAU CAA CUU GAA AAA GUG GCA CCG AGU CGG UGC UUU U-3'

1.3 Sense sgRNA Oligo 的序列组成

5' - **AAGC** **TTCTAATACGACTCACTATAGG** (NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN) **GTTT** **TAGAGCTAGA**-3'
保护碱基 **T7 启动子序列** **设计的靶位点序列** **互补序列区**

本试剂盒提供的 Positive Sense sgRNA Oligo 阳性质控品序列如下

5'-**AAGCTTCTAATACGACTCACTATAGG****TGCAACCTTCATTTCCCTGC**GTTTTAGAGCTAGA-3' (阳性质控品序列)
 (anti sgRNA Oligo序列) 3'-CAAAATCTCGATCTTATCGTTCTTATCC
 GATCAGGCAATAGTTGAACTTTTTACCGTGGCTCAGCCACGAAAAA-5'

1.4 转录后获得的 sgRNA 序列如下, 其中: GG 转录起始位点; 方框中序列为 gRNA 区; 下划线为 crRNA 区。

GGU GCA ACC UUC AUU UCC CUG CGU UUU AGA GCU AGA AAU AGC AAG UUA AAA UAA GGC UAG
UCC GUU AUC AAC UUG AAA AAG UGG CAC CGA GUC GGU GCU UUU-3'

2. 转录 sgRNA 体系的配制

2.1 按以下组分配制反应液 (按顺序加入)

Sense sgRNA Oligo (5μM)	2 μl (需要自行设计, 并合成)
Anti sgRNA Oligo (5μM)	2 μl
2×sgRNA Reaction Mix	10 μl
sgRNA Enzyme Mix	2 μl
RNase Free H ₂ O upto	20 μl

注意: Sense sgRNA Oligo 需要自行设计并合成, 本试剂提供的 Positive Sense sgRNA Oligo 作为实验质控品。

2.2 37℃反应 4h, 转录 RNA 产量在 50~80 μg。

2.3 转录完成后, 向反应液中加入 2.5 μl 的 10×RD Buffer 和 2 μl RNase Free DNase I, 37℃孵育 15min 去除 DNA 模板。

2.4 反应完毕后, 可取 0.1μl 进行电泳检测或放置-80℃保存。

2.5 选用 LiCl 沉淀或 5min RNA Purification Kit (HaiGene, B1333) 进行转录 RNA 的纯化, 以去除盐、NTP、蛋白等。