

Version 2

Code No. AG51101

SinGuiD sgRNA 体外转录试剂盒

SinGuiD sgRNA In Vitro Transcription Kit

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



➤ 产品概述

本产品是用于体外转录获得 sgRNA 的试剂盒，包含 **PCR 扩增试剂**（用于扩增体外转录用模板 dsDNA）与**体外转录试剂**两部分。以 Cas9 特异性识别的骨架序列为模板，使用专门设计的上游特异引物（包含有 T7 启动子序列、目的基因特异序列及骨架部分重叠序列），在 DNA 聚合酶的作用下生成 dsDNA，再以此 dsDNA 为模板（扩增的模板可直接用于转录，无需纯化），通过 T7 RNA 聚合酶，可合成 30 μg 左右具有功能的 sgRNA。

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 是在许多细菌和古细菌中发现的基因组位点，CRISPR/Cas9 系统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系统，可用来对抗入侵的病毒及外源 DNA。研究发现，CRISPR/Cas9 可作为基因编辑技术对细胞的 DNA 靶向位点进行特异性切割，在细胞对损伤修复时可能会造成基因敲除或敲入等，最终达到对基因组 DNA 进行修饰的目的。

Cas9(CRISPR-associated protein 9)是一种双链 DNA 内切酶；sgRNA(Single Guide RNA)包含 2 部分，由结合特定 DNA 靶标的 20 个核苷酸的 crRNA (CRISPR RNA)序列以及结合 Cas9 蛋白的 tracrRNA (transactivating crRNA) 序列组成的单链 RNA。当含有 20 nt 目标序列的 sgRNA 与具有双链 DNA 内切酶活性的 Cas9 蛋白结合时，形成活性核糖核蛋白(RNP)将对目标 DNA 双链进行特异性的切割，导致 DNA 双链断裂。

➤ 产品组成

组分名称	AG51101 (50 rxns)
2X <i>ApexHF</i> FS PCR Master Mix	625 μl X 2 pcs
Scaffold Template (2 ng/ μl) ^{*1}	250 μl
Control sgRNA Oligo (10 μM) ^{*2}	5 μl
In Vitro Transcription Buffer	875 μl
T7 RNA Polymerase Mix	250 μl
DNase I (RNase free) (5 U/ μl)	100 μl
2X RNA Loading Dye	250 μl
RNase free water	1 ml X 2 pcs

*1: Scaffold Template 中包含 PCR 扩增用骨架模板与下游引物。

*2: Control sgRNA Oligo 为对照 sgRNA 上游引物。

➤ 保存及运输

保存温度：-20℃保存

运输温度：-20℃冰袋运输或干冰运输

➤ 产品优势

1. 本产品操作简单，含有 PCR 扩增用模板 Scaffold Template（包含能被 Cas 9 蛋白识别的特异性序列及下游引物），仅需要设计与靶标基因匹配的 sgRNA 扩增引物即可进行转录获得 sgRNA。
2. 搭配使用本公司的高保真酶 2X *ApexHFFS* PCR Master Mix 进行 PCR 扩增，确保转录用 dsDNA 模板的准确性。
3. 收量高，每个反应可获得 30 μg 以上高质量的 sgRNA。

➤ 实验原理

*SinGuiD*sgRNA 体外转录试剂盒提供了一种简单快速的方法，使用特异性目标引物，转录获得高质量 sgRNA。产品分为**转录模板扩增**和**sgRNA 体外转录**两部分，具体操作如下：

1. 转录模板扩增：Scaffold Template（含有骨架和下游引物）与上游特异性引物【包含 T7 启动子序列、20 nt 靶向序列及与骨架部分重叠区域三部分，引物设计见下述步骤：[上游特异性引物 \(Target-specific sgRNA Oligo\) 设计](#)】，在 2X *ApexHFFS* PCR Master Mix 的作用下进行 PCR 扩增获得双链 DNA 模板。
2. sgRNA 体外转录：直接以上述 PCR 产物为模板，无需纯化，在 T7 RNA 聚合酶作用下转录合成含有目标序列的 sgRNA。

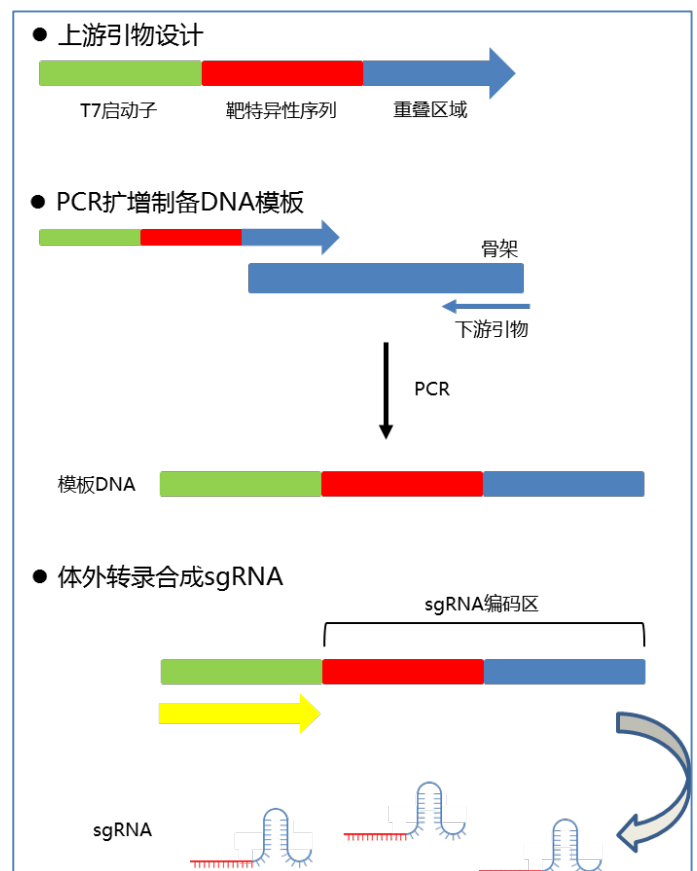


图 1: sgRNA 体外转录原理

➤ 上游特异引物 (Target-specific sgRNA Oligo) 设计

该特异引物应包含三部分 (5'-3'): T7 启动子序列, 20 nt DNA 靶序列和骨架重叠序列, 如图 2 所示:

1. 引物 5'端: 4 个保护碱基(CCTC)和 T7 启动子序列(TAATACGACTCACTATA) 共 21 nt。
2. 转录起始位点添加 0~2 个鸟嘌呤(G)碱基: 添加的 G 的数量取决于目标序列的 5'端。T7 启动子至少需要两个 G 才能有效转录 (如果靶向目标序列已经包含两个 G, 则无需添加额外的 G, 额外的 G 可能会降低剪切效率)。
3. 20 nt DNA 靶序列: 20 nt DNA 靶序列【 不包含 PAM (NGG) 位点】, 靶位点的选择, 可以用以下软件进行设计:
 Desktop Genetics (www.deskgen.com/landing) 或
 ChopChop (<https://chopchop.cbu.uib.no/>)
4. 引物 3'端: 与 Scaffold Template 溶液中含有的骨架序列互补序列 (GTTTAAGAGCTATGC 共 15 nt)。

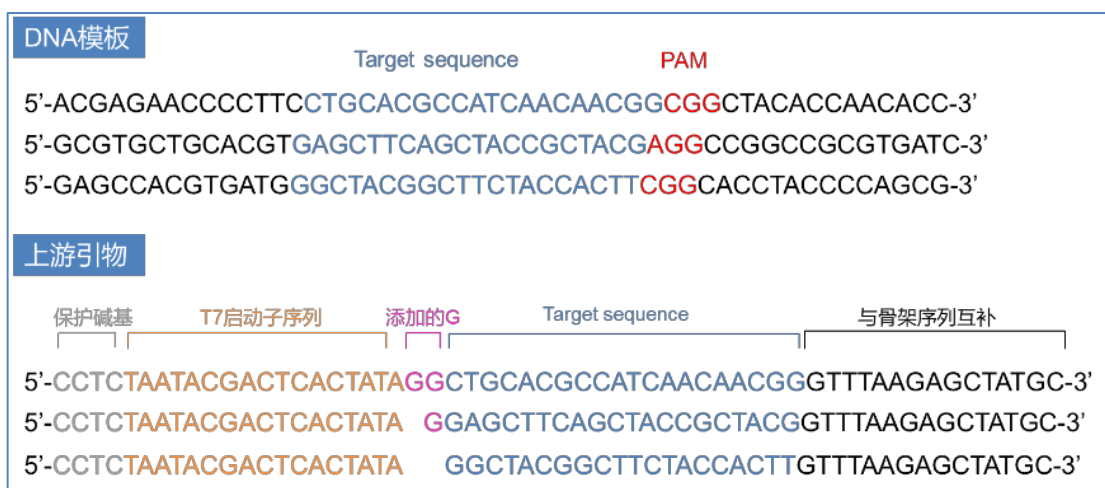


图 2: 上游引物设计示例

➤ 实验前准备

1. 试剂 & 耗材:

- 1) Target-specific sgRNA Oligo (10 μ M) ; sgRNA 纯化试剂盒 (如 *SteadyPure* RNA 纯化试剂盒 (Code No.AG21033) 或其他等效产品;
- 2) 0.2ml RNase free PCR 管, 1.5 ml 离心管。

2. 仪器:

PCR 仪、紫外分光光度计或 NanoDrop 微量分光光度计或者其他等效仪器、桌面离心机、振荡器、移液器等。

➤ 操作方法

A. sgRNA 转录模板扩增

1. 按照下表在冰上配制 PCR 反应体系：

组分	终浓度	加入体积(μl)
2X <i>ApexHF</i> FS PCR Master Mix ^{*1}	-	25
Scaffold Template (2 ng/μl)	-	5 ^{*2}
Target-specific sgRNA Oligo (10 μM)	0.2 μM ^{*3}	1
RNase free water	-	up to 50

*1: 2X *ApexHF* FS PCR Master Mix 使用前先离心，将所有的溶液收集至离心管底部，然后再进行使用，减少损失；溶液中甘油浓度较高，使用时应轻柔混匀（避免起泡），缓慢吸取；

*2: Scaffold Template 中含有骨架模板与下游引物，推荐使用量为 5 μl，若扩增条带较弱，可尝试增加用量；若扩增条带有非特异性扩增，可尝试减少用量，根据实际情况在可 1 ~ 10 μl 范围内调整；

*3: Target-specific sgRNA Oligo 的使用量一般推荐 0.2 μM，若扩增条带较弱，可尝试增加引物用量；若扩增条带有非特异性扩增，可尝试降低引物用量，建议在 0.1 ~ 0.4 μM 范围内调整。如果使用本产品中 Control sgRNA Oligo，取 1 μl 进行 PCR 反应扩增。

2. 将加好样的 Tube 放置于 PCR 仪中，然后按照下表条件进行 PCR 反应：

温度	时间	循环数
94°C	30 sec	1
98°C	10 sec	} 30
55°C	5 sec	
72°C	5 sec	
4°C	Hold ^{*1}	

*1: 反应产物在电泳检测时，可暂放于 4°C 保存；如长时间保存建议放置于 -20°C。

3. 结果检测：

反应结束后可取适量的反应液进行琼脂糖凝胶电泳检测产物。推荐使用 2% 琼脂糖胶，取 5 μl PCR 反应液检测条带大小及亮度，可获得大小 ~130 bp 左右单一条带，且条带明亮。

4. 检测合格后，将产物保存在 4°C 或冰上，可直接进行后续的 **B. sgRNA 体外转录**。若长期保存，建议放置于 -20°C。

B. sgRNA 体外转录

步骤 A 扩增的 PCR 产物直接作为模板进行体外转录反应，无需纯化。

1. 按照下表在冰上配制体外转录体系：

组分	终浓度	体积(μl)
In Vitro Transcription Buffer	-	17.5
T7 RNA Polymerase Mix	500 U	5
sgRNA 模板 (步骤 A 的 PCR 产物)	-	12.5
RNase free water	-	up to 50

2. 在 PCR 仪中运行以下程序：

温度	时间
37°C	4 h ^{*1}
4°C	Hold ^{*2}

*1: 转录时间一般推荐 4 h, 可以在 2-16h 范围内进行调整。

*2: 转录产物从仪器中取出后, 放置在冰上, 建议尽快进行后续 DNA 模板消化。

若不能及时进行后续的 DNA 模板消化及转录产物纯化, 建议-80°C保存。

3. DNA 模板消化：

转录反应完成后, 加入 2 μl DNase I (RNase free), 在 PCR 仪中 37°C 孵育 15 min 去除模板 DNA。反应结束后取出反应液放置于冰上, 直接进行后续的 **C. 转录产物纯化**。

C. 转录产物纯化

使用 RNA 纯化试剂盒对 sgRNA 进行纯化, 以本公司的 *SteadyPure* RNA 纯化试剂盒 (Code No. AG21033) 为例。整个纯化实验在室温下进行, 具体操作步骤如下：

注意：使用前确认 Buffer RWB 已经添加了 63 ml 无水乙醇。

1. 将上述转录反应液 50 μl 样品转入 1.5 ml 离心管, 向其中加入 100 μl 的 Buffer RBS;
2. 向上述离心管中加入 150 μl 无水乙醇, 上下颠倒混匀 10 次, 短暂离心;
3. 将上述溶液转移至 RNA Mini Column 中, 室温静置 1 min, 12,000 rpm 室温离心 1 分钟, 弃滤液;
4. 向上述 RNA Mini Column 中加入 700 μl 的 Buffer RWB, 12,000 rpm 室温离心 1 min, 弃滤液 (注: 请确认 Buffer RWB 中已经加入了指定体积的 100%乙醇);

5. 重复步骤 4) 一次；
6. 将上述 RNA Mini Column 置于新的 2 ml Collection tube 上，12,000 rpm 室温离心 2 min 去除残余液体（注：此步骤需竖直将吸附柱取出，避免吸附柱柱头触碰收集管壁）；
7. 将吸附柱安置于新的 1.5 ml 离心管上，在吸附柱膜的中央处加入 30 μ l RNase free Water，室温静置 1 min，12,000 rpm 离心室温 2 min 洗脱 sgRNA，于 -80°C 下保存。

D. sgRNA 浓度及片段大小检测

1. **sgRNA 浓度测定：**使用紫外分光光度计或 NanoDrop 微量分光光度计或等效仪器测定 sgRNA 浓度，一般可获得超过 30 μ g sgRNA。OD₂₆₀ 为 1 时，对应的单链 RNA (ssRNA) 浓度为 40 μ g / ml。
2. **sgRNA 片段大小检测：**琼脂糖凝胶电泳检测 sgRNA 的片段大小。由于 sgRNA 有复杂的二级结构，需要在电泳前进行变性，可按照下述方法操作：
 - 1) 按照下表配制电泳变性反应液：

组分	体积(μ l)
2X RNA Loading Dye	5
纯化后的 sgRNA	1
RNase free water	up to 10

- 2) 在 PCR 仪中 90°C 孵育 5 min；
- 3) 使用 2% TBE 琼脂糖胶，取 10 μ l 上述反应液电泳检测条带大小及亮度，可获得大小为 110 nt 左右单一条带。

➤ 实验例

1. 以本产品中的 Control sgRNA Oligo 为上游引物，采用本产品进行 PCR 扩增获得 dsDNA 模板，然后以此 dsDNA 为模板进行体外转录 4 h，使用 *SteadyPure* RNA 纯化试剂盒 (Code No. AG21033) 纯化，可获得 30 μ g 以上的 sgRNA，电泳结果如下图 (左) 所示。将转录的 sgRNA 使用 *SinGuiD* sgRNA 体外筛选试剂盒 (Code No. AG51102) 进行验证，能够将目的片段 (716 bp) 剪切成两个 DNA 片段 (447 bp 和 269 bp)，电泳结果如下图 (右) 所示。

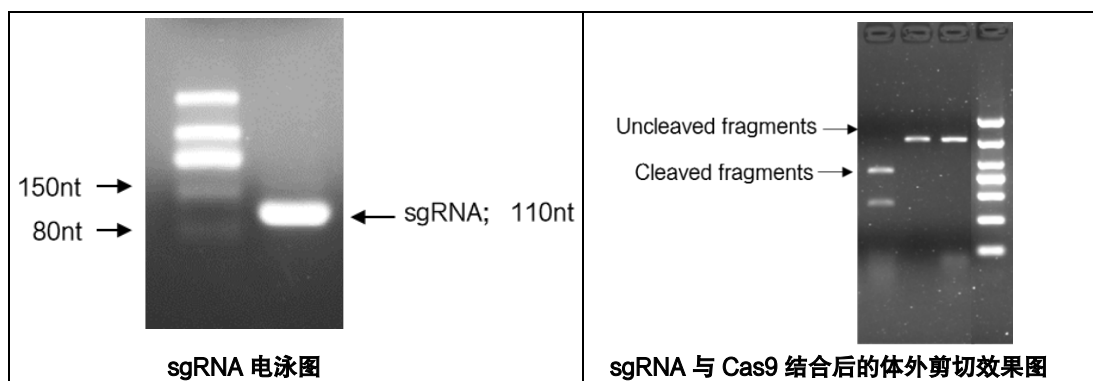


图 4: sgRNA 电泳图和体外剪切效果图

➤ 产品注意事项

1. 防污染措施:

- ❖ 本产品是制备 sgRNA，进行转录反应时需要注意防止 RNase 污染，需要使用无菌无酶的器具，操作过程中要避免讲话，且需要穿实验服，戴一次性口罩和手套等防止 RNA 被污染或降解。

2. 上游引物设计:

应严格按照 **上游特异引物 (Target-specific sgRNA Oligo)** 设计的建议进行引物设计，否则可能会导致 sgRNA 产量过低。

- ❖ DNA 靶序列选择必须以 PAM 序列 (如 NGG) 在其 3' 端结束;
- ❖ 整个靶序列 (不包括 PAM 位点) 应与任何其他非靶基因组序列至少有三个碱基错配，降低脱靶率;
- ❖ 正向 PCR 引物 (5'-3') 应包含保护碱基 (4 nt) + T7 启动子 (17 nt) + GG + 特异 sgRNA 靶序列 (20 nt) + 骨架重叠序列 (15 nt);
- 🚩 如果您的特定目标序列已经包含两个 G，则无需添加额外的 G 用于转录起始，额外的 G 会降低剪切效率。

3. sgRNA 转录时间:

- ❖ 推荐转录时间定为 4 h，可适当延长体外转录的孵育时间，增加转录产量; 转录时间不充足，可能会导致 sgRNA 产量过低。

4. 转录目的序列:

- ❖ 转录可能在一定程度上依赖于序列，不同的 sgRNA 转录产量有一定的差异，大多数 sgRNA 转录反应的产量在 30 μ g 左右。建议为每个目标设计多个 sgRNA，避免出现 sgRNA 产量过低的情况。

5. sgRNA 电泳检测：

- ❖ 建议使用 2X RNA Loading Dye 进行变性，并在 PCR 中 90°C 孵育 5 min；如果不进行变性，由于 sgRNA 存在复杂二级结构，在凝胶上可能会出现多个条带。
- ❖ 在 sgRNA 纯化之前需要使用 DNase I 对样品进行处理。如果未进行处理，DNA 模板与 sgRNA 会同时被检测到，其条带大小略大于 sgRNA。

6. sgRNA 转录模板的影响：

- ❖ PCR 扩增的转录模板量不够或者有杂带，可能会导致转录产量偏低，建议优化 PCR 反应条件，以获得单一且产量足够的条带。若 PCR 条带有杂带，建议减少 Scaffold Template 和 Target-specific sgRNA Oligo 的用量，以获得单一条带；若 PCR 产物产量不足，建议增加 Scaffold Template 和 Target-specific sgRNA Oligo 的用量以获得较好的扩增条带。