

## Hifair<sup>®</sup> Precision sgRNA Synthesis Kit

### 产品信息

产品名称	产品编号	规格
	11355ES25	25 T
Hifair <sup>®</sup> Precision sgRNA Synthesis Kit	11355ES50	50 T
	11355ES60	100 T

### 产品描述

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，源于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。在现代生物技术研究中，此系统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，从而引起 DNA 断裂。由于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。

Hifair<sup>®</sup> Precision sgRNA Synthesis Kit 采用 T7 RNA 聚合酶混合物高效转录 spCas9 sgRNA。本试剂盒含有能被 Cas9 蛋白识别并起支架作用的特异性序列，该序列的一部分能与使用者设计的目标特异序列部分重叠。退火形成互补链后由 DNA 聚合酶进行填充。最终生成用于转录的 dsDNA 模板。本试剂盒利用其提供的试剂和使用者自己设计的特异性 DNA 序列，单管反应可在 4 小时内获得 20-100 $\mu$ g 具有功能的 sgRNA。

### 产品组分

编号	组分	产品编号/规格		
		11355ES25 (25 T)	11355ES50 (50 T)	11355ES60 (100 T)
11355-A	10 $\times$ sgRNA Enzyme Mix	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L
11355-B	10 $\times$ sgRNA Reaction Buffer	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	200 $\mu$ L
11355-C	2 $\times$ Canace Enzyme Mix	312.5 $\mu$ L	625 $\mu$ L	1.25 mL
11355-D	Scaffold Template	31.25 $\mu$ L	62.5 $\mu$ L	125 $\mu$ L
11355-E	NTPs (25mM each)	200 $\mu$ L	400 $\mu$ L	800 $\mu$ L
11355-F	Control sgRNA Oligo (10 $\mu$ M)	10 $\mu$ L	20 $\mu$ L	40 $\mu$ L

### 运输储存方法

干冰运输。-20 $^{\circ}$ C 保存，有效期两年。

### 注意事项

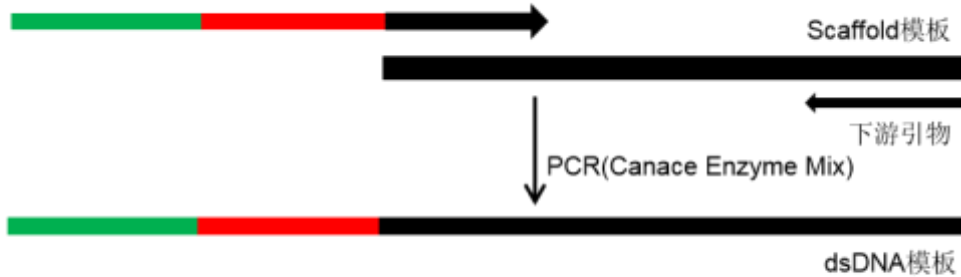
1. 反应体系中须严格注意不要混入 RNase。
2. 实验器材（如：枪头、产品管等）注意严格使用 RNase Free 用品。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 合成原理

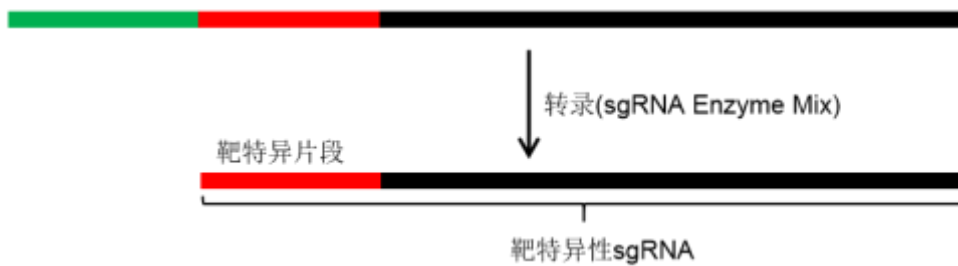
### 1. 上游引物设计 (sgRNA Oligo)



### 2. PCR扩增制备dsDNA模板



### 3. 体外转录合成sgRNA



## 操作流程

### 1. 上游引物 (Target-specific sgRNA oligo) 设计

- 引物的 5'端: T7 启动子序列加保护碱基 (20nt: TTCTAATACGACTCACTATA)
- 转录起始位点: 添加 0~2 个 G, 添加 G 的个数由靶序列的 5'端决定, T7 启动子至少需要 2 个 G 才能有效转录。  
(注: 若特异靶序列已经存在 2 个 G, 则不需要额外添加, 额外的 G 会降低剪切效率。)
- 特异的 sgRNA 靶序列 (20nt): 靶 DNA 序列 PAM (NGG) 的 5'端 20nt 碱基序列。
- 引物的 3'端: Scaffold Template 退火序列 (14nt: GTTTTAGAGCTAGA)。

示例:

DNA 模板:

```

          靶序列                PAM
          |-----|            |
CACAACCTCCGTCATAAACATCTTGTGAGGGCAGTGGCCATGGCGCGGA
CTTGGCCAGTTGGCAGTGCTGTGACTGCTTGTAGAGGGAGTACTGTAGGA
GTTGTAGTGGATGGTGGTACAGTCAGAGCCAACCTAGGAGATAACACAGG
    
```

上游引物 (Target-specific sgRNA oligo) :

```

保护碱基   T7 启动子序列   添加的 G   靶序列   Scaffold Template 退火序列
|-----|-----|-----|-----|-----|
TTCTAATACGACTCACTATAGGAAACATCTTGTGAGGGCAGGTTTTAGAGCTAGA
TTCTAATACGACTCACTATA  GGTGCTGTGACTGCTTGTAGAGTTTTAGAGCTAGA
TTCTAATACGACTCACTATA  GGTACAGTCAGAGCCAACCTGTTTTAGAGCTAGA
    
```

## 2. sgRNA 合成

### A. sgRNA 模板扩增

①按下列体系配制反应体系:

组分	体积 (μL)	终浓度
RNase free H <sub>2</sub> O	Up to 25	-
Scaffold Template	1.25	-
sgRNA Oligo (10μM)	1.25	0.5μM
2×Canace Enzyme Mix	12.5	1×

注: 1. Scaffold Template 已预先与下游引物混合。

2. 使用试剂、容器等无 RNase 污染。

②PCR 反应程序:

循环步骤	温度	时间	循环数
变性	98℃	10s	30
延伸	68℃	10s	
保持	4℃	∞	

③电泳检测:

使用 2%琼脂糖胶, 取 5μL PCR 反应液电泳检测条带大小及亮度, 用 100bp DNA Ladder (货号: 10507) 标定, 其大小为 120bp 左右单一条带。

### B. 体外转录 sgRNA

①按下列体系室温配制反应体系:

组分	体积 (μL)	终浓度
RNase free H <sub>2</sub> O	Up to 20	-
10×sgRNA Reaction Buffer	2	1×
NTPs (25 mM each)	8	10 mM each
sgRNA 模板 (上述 A 获得)	5	-
10×sgRNA Enzyme Mix	2	1×

注: 1. 低温配置可能引起 DNA 模板沉淀。

2. 使用试剂、容器等无 RNase 污染。

②反应程序:

温度	时间
37℃	4h
4℃	∞

注: 反应于 PCR 仪中进行, 热盖打开, 防止长时间导致反应液蒸发。

③DNA 模板消化:

反应完成后, 每管加入 2μL DNase I (RNase free), 37℃孵育 15min 以去除模板 DNA。

④转录产物纯化:

体外转录产物可选用 RNA Cleaner 磁珠进行纯化 (货号: 12602), 也可以采用酚/氯仿纯化法 (具体操作步骤可联系 Yeasen 索取), 以去除蛋白、游离的核苷酸等。