

spCas9-gRNA 靶点效率检测试剂盒 (Catalog. No. VK007)
产品组成

	组成	货号	编号	VK007-10T	VK007-30T
spCas9 酶切试剂	spCas9 (1U/μL)	VK007-10	1#	12μL	34μL
	10× spCas9 buffer	VK007-11	2#	50μL	200μL
体外转录试剂	T7 RNA Polymerase Mix (5U/μL)	VK010-01	3#	22μL	62μL
	rNTP (100 mM, rATP/rUTP/rCTP/rGTP)	VK010-02	4#	24μL	64μL
	10× Transcription Buffer	VK010-03	5#	24μL	64μL
	Stop Solution	VK010-04	6#	200μL	500μL
	DNaseI (1U/μL)	VK010-05	7#	24μL	64μL
标准 gRNA 试剂	标准 gRNA 模板(50ng/μL)	VK007-12	8#	20μL	60μL
	标准 gRNA1(g1)引物 g1-FP(10μM)	VK007-13	9#	10μL	30μL
	标准 gRNA2(g2)引物 g2-FP(10μM)	VK007-14	10#	10μL	30μL
	反向引物 gRNA-RP(10μM)	VK007-15	11#	30μL	100μL
	DEPC H ₂ 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℃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 spCas9/gRNA 体外酶切靶点 DNA 片段，进行 gRNA 靶点活性的评估。体外 spCas9 酶切 DNA 效果与 DNA 浓度、spCas9 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 spCas9 酶量，在一定单位时间内，测量 spCas9 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

公司网站：www.v-solid.com 电话：13810006487

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	TAATACGACTCACTATAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
gRNA-RP (VK007-15)	AGCACCGACTCGGTGCCACTT

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 10uM）和 gRNA-RP（VK007-15）引物对，以标准 gRNA 模板（VK007-12）为模板做 PCR（PCR 产物 120bp 左右），对于每个样品请按如下 50ul 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 NuHigh Power MixDye-free，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（VK007-12, 5ng/ul）	2ul
T7-gRNA-FPg（10uM）	2ul
gRNA-RP（VK007-15, 10uM）	2ul
NuHigh Power MixDye-free(2×)	25ul
DEPC H ₂ O（VK010-06）	19ul
Total	50ul

PCR 程序如下：

```

95°C    10 min
95°C    15 sec
60°C    30 sec  } 32 Cycles
68°C    15 sec
68°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 3ul 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 40ul DEPC H₂O 洗脱 DNA，测浓度（至少要 ≥70ng/ul，若浓度太低请浓缩处理或重新扩增 3~4 管 50ul 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 (VK007-13, 10uM) 或者标准 gRNA2(g2)引物 g2-FP (VK007-14, 10uM) 和 gRNA-RP (VK007-15, 10uM) 引物对, 以标准 gRNA 模板 (VK007-12) 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 (VK007-15)	AGCACCGACTCGGTGCCACTT

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 10uM) 和 gRNA-RP (VK007-15) 引物对, 以带有 gRNA 靶点的 gRNA 表达质粒 (使用唯尚立德 spCas9 CRSIPR 质粒构建试剂盒 VK001 or vk005 系列构建) 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。

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, ddH₂O 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)	2 ul
rNTP (VK010-02)	2 ul
T7 RNA Polymerase Mix (VK010-01)	2 ul
gRNA PCR 产物 (上一步产物)	1ug (≤14ul)
DEPC H ₂ O (VK010-06)	up to 20 ul

以上混合后, 37°C 过夜反应 (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 2 ul DNase I (VK010-05), 37°C 反应 40-60 分钟。

三) gRNA 的回收与提取:

- 1) 加入 112ul DEPC 水 (VK010-06)、18ul Stop Solution (VK010-04) 混匀后, 加入 2 倍体积 (即 300ul) 的无水乙醇 (自备, 注意无 RNase 污染), 充分混匀后, -20℃ 冻存 3 小时以上 (一般过夜处理)。
- 2) 13000rpm 4℃ 离心 20 min, 去除上清保留沉淀。
- 3) 加入 450ul 的 70% 冷乙醇清洗 (自备, 注意用 DEPC 水配制), 13000rpm 4℃ 离心 15 min, 去除上清保留沉淀, 再 13000rpm 4℃ 离心 1 min, 小心吸净残留的液体, 室温晾置 1~2min 后, 加入 40ul DEPC 水溶解 RNA 沉淀。
- 4) 测量 RNA 浓度 (一般在 300~800ng/ul, 若浓度过高, 请取 1ul 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 spCas9/gRNA 酶切实验, 或者 -80℃ 保存待用。

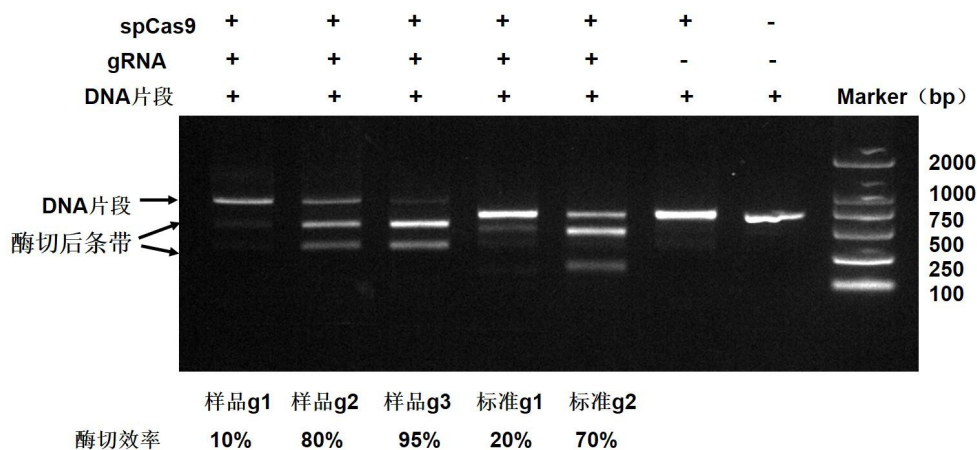
2. spCas9/gRNA 体外酶切反应

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
spCas9	1ul	1ul	1ul
10XspCas9 buffer	2 ul	2 ul	2 ul
gRNA (体外转录)	50 ng (样品 gRNA)	50 ng (标准 gRNA1(g1))	50 ng (标准 gRNA2(g2))
ddH2O	x ul	x ul	x ul
酶切的 dsDNA	50 ng (客户准备)	1ul (VK007-12, 50ng/ul)	1ul (VK007-12, 50ng/ul)
Total	20ul	20ul	20ul

充分混合后, 37℃ 反应 30min, 加入 3ul DNA Loading Buffer (自备) 混合后 65℃ 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:

标准 gRNA1(g1) 和标准 gRNA2(g2) 经过 SSA luciferase 检测过活性, 其 SSA 活性分别为:

标准 gRNA1(g1)=3

标准 gRNA2(g2)=10, 因此

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

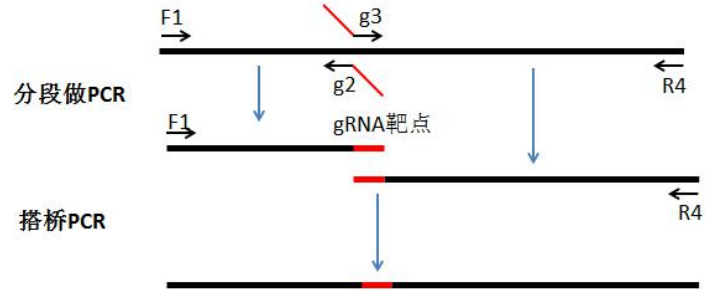
若样品 gRNA 的酶切效率 \geq 标准 gRNA2(g2)，表明样品 gRNA 靶点活性非常高，建议使用。

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



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。