

一步法 sgRNA 合成试剂盒说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

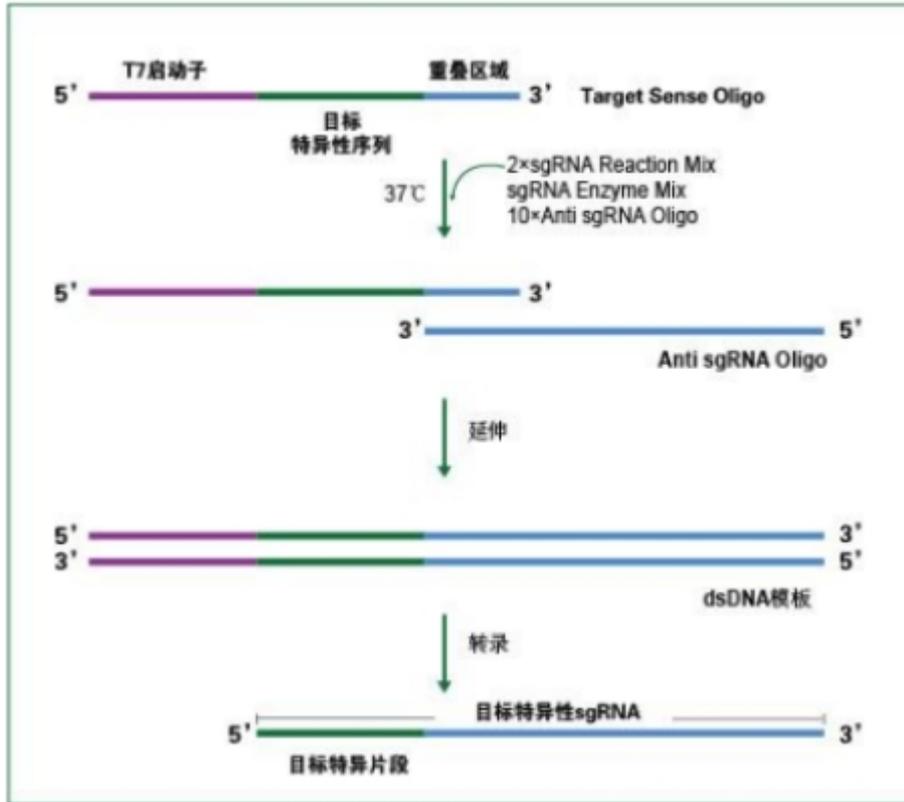
描述:

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 30~50 μ g 的 sgRNA。

组分

名称	10T	50T
2×sgRNA Reaction Mix	100 μ l	500 μ l
sgRNA Enzyme Mix	20 μ l	100 μ l
10×Anti sgRNA Oligo(5 μ M)	20 μ l	100 μ l
RNase Free DNase I	20 μ l	100 μ l
RNase Free H2O	1 ml	1 ml

原理:



保存：-20℃可保存 2 年，避免反复冻融。

1. Target Sense Oligo 的设计

选取 Target DNA 序列 PAM(NGG)的 5'端 20bp 进行 Sense Oligo 引物设计, Sense Oligo 引物结构包含保护碱基(AAGC)、T7 promoter(TTCTAATACGACTCACTATAGG)、Target DNA 片段 (20bp) 和互补片段(GTTTTAGAGCTAGA)。

Sense Oligo 设计如下：

Target Sense Oligo: 5'-AAGCTTCTAATACGACTCACTATAGG (N)₂₀ GTTTTAGAGCTAGA-3'
3'-CAAAATCTCGATCTTTATCGTTCAATTTT
ATCCGATCAGGCAATAGTTGAACTTTTTACCGTGGCTCAGCCACGAAAAA-5' Anti sgRNA Oligo

如靶序列如下：

CTCAGTATGATGCTTCTGAGCTGAAAGCGTCCATGAAGGGGCTGGGACTGATGAGGACTCTCTCATTGAGATT
CTGCTCAAGGACCAACCAGGAGCTGCAGGAAATCAACAGAGTCTACAAGGAAATGTACAAGACCGATCTGGAG
AAGGACA TGCAACCTTCATTCCCTGC TGG TGGTTCCGACACCTGGCCACCTGGAGACAGTGATTTGGGCCCT
ATTGAAAACACCTG

方框中为设计的 sgRNA 靶区域，根据 sgRNA 靶区序列需要合成的 Target Sense Oligo 入列为：

Target Sense Oligo: 5'-AAGCTTCTAATACGACTCACTATAGG TGCAACCTTCATTCCCTGC GTTTTAGAGCTAGA-3'
3'-CAAAATCTCGATCTTTATCGTTCAATTTT
TATCGTTCAATTTTATCCGATCAGGCAATAGTTGAACTTTTTACCGTGGCTCAGCCACGAAAAA-5' Anti
sgRNA Oligo

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。

5'-GG UGCAAGGUUCAUUUCCUGC GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA

2. 转录 sgRNA 体系的配制

(1) 按以下组分配制反应液 (按顺序加入)

<u>Target Sense Oligo (5μM)</u>	<u>2 μl</u>
<u>10\timesAnti sgRNA Oligo (5μM)</u>	<u>2 μl</u>
<u>2\timessgRNA Reaction Mix</u>	<u>10 μl</u>
<u>sgRNA Enzyme Mix</u>	<u>2 μl</u>
<u>RNase Free H2O upto</u>	<u>20 μl</u>

(2) 37 $^{\circ}$ C 反应 2~4h(或过夜), 转录 RNA 产量在 30~50 μ g。

(3) 转录完成后, 向上述反应液中加入 2 μ l RNase Free DNase I, 37 $^{\circ}$ C 孵育 15min 去除 DNA 模板。

(4) 反应完毕后, 可电泳检测或放置-80 $^{\circ}$ C 保存。或选用 5min RNA Purification Kit 进行转录 RNA 的纯化, 以去除盐、NTP、蛋白等。