

**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 <sub>2</sub> 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](http://www.v-solid.com) 电话: 010-62963369 订购邮箱: [order@v-solid.com](mailto:order@v-solid.com)

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 <sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O 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, ddH<sub>2</sub>O 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 <sub>2</sub> 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:

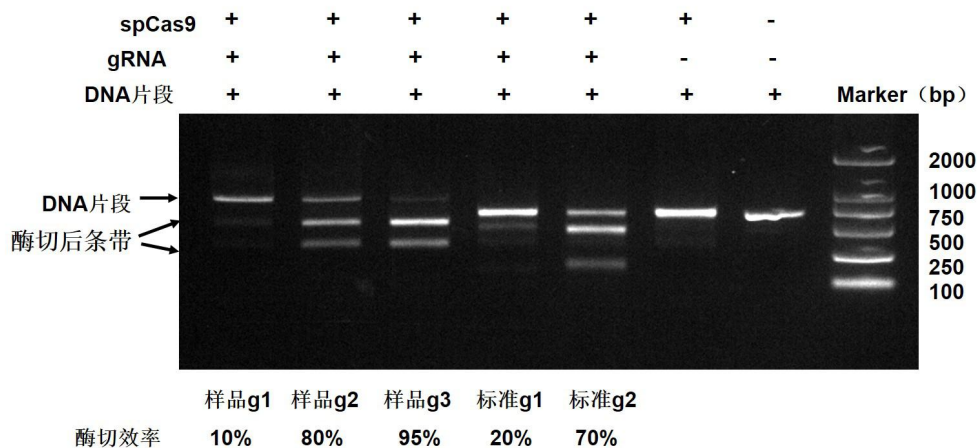
- 1) 加入 112ul DEPC 水 (VK010-06)、18ul Stop Solution (VK010-04) 混匀后, 加入 2 倍体积 (即 300ul) 的无水乙醇 (自备, 注意无 RNase 污染), 充分混匀后, -20℃ 冻存 3 小时以上 (一般过夜处理)。
- 2) 13000rpm 4℃ 离心 20 min, 去除上清保留沉淀。
- 3) 加入 450ul 的 70% 冷乙醇清洗 (自备, 注意用 DEPC 水配制), 13000rpm 4℃ 离心 15 min, 去除上清保留沉淀, 再 13000rpm 4℃ 离心 1 min, 小心吸净残留的液体, 室温晾置 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

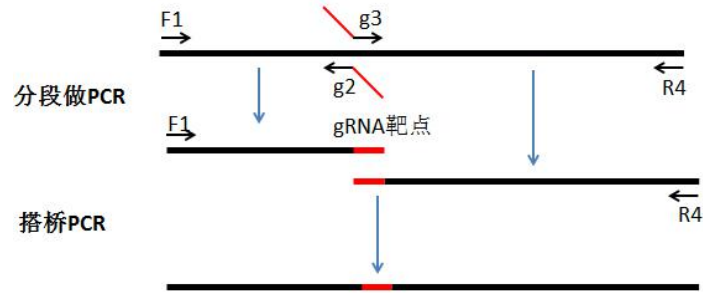
若样品 gRNA 的酶切效率  $\geq$  标准 gRNA2(g2)，表明样品 gRNA 靶点活性非常高，建议使用。

## 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。