

SinGuiD sgRNA 体外转录试剂盒

SinGuiD sgRNA In Vitro Transcription Kit

Code No. AG51101

包装量:	50 rxns / 50 μ l
保存温度:	-20°C 保存

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 20 μ g 左右具有功能的 sgRNA。

产品组成

2X <i>ApexHF</i> FS PCR Master Mix	625 μ l X 2 pcs
Scaffold Template (2 ng/ μ l) *1	250 μ l
Control sgRNA Oligo (10 μ M) *2	5 μ l
In Vitro Transcription Buffer	875 μ l
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	62.5 μ l
T7 RNA polymerase (100 U/ μ l)	125 μ l
DNase I (RNase free) (5 U/ μ l)	100 μ l
2X RNA Loading Dye	250 μ l
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°C 保存

运输温度: -20°C 冰袋运输或干冰运输

实验操作

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 (μ l)
2X <i>ApexHF</i> FS PCR Master Mix*1	-	25
Scaffold Template (2 ng/ μ l)	-	5*2
Target-specific sgRNA Oligo (10 μ M)	0.2 μ M*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 μ l，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，根据实际情况可在 1 ~ 10 μ l 范围内调整；

*3: Target-specific sgRNA Oligo 的使用量一般推荐 0.2 μ M，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 μ M 范围内调整。如果使用本产品中 Control sgRNA Oligo，取 1 μ l 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; 如长期保存建议放置于-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 μ l 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, 可直接进行后续步骤 **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 (μ l)
In Vitro Transcription Buffer	-	17.5
T7 RNA polymerase (100 U/ μ l)	250 U	2.5
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	50 U	1.25
sgRNA 模板 (步骤 A 的 PCR 产物)	-	12.5
RNase free water	-	Up to 50

详细信息请查阅 www.agbio.com.cn

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.

2. 在 PCR 仪中运行以下程序:

温度	时间
37°C	4 h
4°C	Hold ^{*1}

*1: 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 μ l 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

选择合适的 RNA 纯化试剂盒对 sgRNA 进行纯化。

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。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。
- a. 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 |
- b. 在 PCR 仪中 90°C 孵育 5 min;
- c. 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。