



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
 订货热线: 400-1683301或800-8283301
 订货e-mail: order@beyotime.com
 技术咨询: info@beyotime.com
 网址: http://www.beyotime.com

BeyoCRISPR™ Two-Step sgRNA Synthesis Kit

产品编号	产品名称	包装
D7083S	BeyoCRISPR™ Two-Step sgRNA Synthesis Kit	20次
D7083M	BeyoCRISPR™ Two-Step sgRNA Synthesis Kit	100次

产品简介:

- 碧云天生产的BeyoCRISPR™ Two-Step sgRNA Synthesis Kit, 即BeyoCRISPR™两步法sgRNA合成试剂盒, 是基于CRISPR/Cas9基因编辑技术而研发的sgRNA (single guide RNA)体外转录合成试剂盒。使用本试剂盒, 用户仅需按照本试剂盒说明书设计并合成Target-specific DNA oligo, 就可以通过本试剂盒每次反应获得10-40μg sgRNA。获得的sgRNA可以用于体外分析和鉴定sgRNA的效果, 也可以用于转染表达Cas9的细胞以实现目的基因的基因编辑。
- CRISPR/Cas9是一项突破性的基因组编辑技术, 操作便捷, 应用广泛。CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)是一种原核生物利用RNA引导的DNA核酸酶Cas9对外源的噬菌体或病毒核酸进行基因沉默的获得性免疫系统 (adaptive immune system), 后续在此基础上逐渐发展为广泛应用于原核和真核生物的越来越成熟的基因编辑技术。该技术能够在sgRNA引导下通过Cas9对原核和真核生物的基因组DNA的靶向序列进行位点特异性的切割, 然后通过易错修复 (error-prone repair)或同源重组 (homologous recombination)在切割位点改变或插入序列来产生移码突变, 从而实现基因敲除。其中sgRNA确保识别位点的特异性。随着CRISPR技术的发展, 该技术目前不仅可以实现基因敲除, 还可以实现基因的点突变、插入突变等多种突变方式, 特别是在临床应用方面可以用于修复不良突变等[1, 2]。同时通过构建没有内切酶活性的Cas9突变体dCas9, 通过与dCas9直接融合表达或间接招募转录激活或转录抑制因子, 可以实现sgRNA靶向基因的转录激活或转录抑制。
- sgRNA, 也称gRNA, 由18-20bp与靶基因序列互补的CRISPR RNA (crRNA)序列以及能与Cas9特异性结合的trans-activating crRNA (tracrRNA)序列组成。在细胞内, Cas9核酸酶可以特异性地结合sgRNA, 同时sgRNA也能特异性地与相应的靶基因序列配对结合, 这样就可以导致Cas9核酸酶在靶基因位点的PAM (proto-spacer adjacent motif)序列NGG上游大约三个碱基的位置对靶基因进行切割。随后在细胞DNA修复过程中会导致基因靶位点处的插入、删除或替换, 从而可能产生移码突变, 导致目的基因的缺失突变[1]。
- 碧云天生产的BeyoCRISPR™ Two-Step sgRNA Synthesis Kit通过PCR扩增和依赖于T7 RNA聚合酶的转录两步法高效产生靶向目的基因的sgRNA。本试剂盒提供了预混合的Scaffold Template, Scaffold Template包括与使用者设计的目标特异性序列部分重叠的长度为80nt序列以及用于扩增该序列的引物, 退火形成互补链后由DNA聚合酶进行聚合, 并最终生成用于转录的双链DNA模板。利用本试剂盒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0.5h-4h内获得10-40μg功能性的sgRNA。纯化后的sgRNA可以转染细胞, 在表达Cas9的细胞中进行基因编辑, 也可以与Cas9核酸酶混合进行酶切鉴定实验。
- 本试剂盒通过两步法合成sgRNA的原理请参考图1。其中第一步通过PCR反应扩增获得用于RNA转录的模板DNA, 第二步通过RNA聚合酶合成sgRNA。

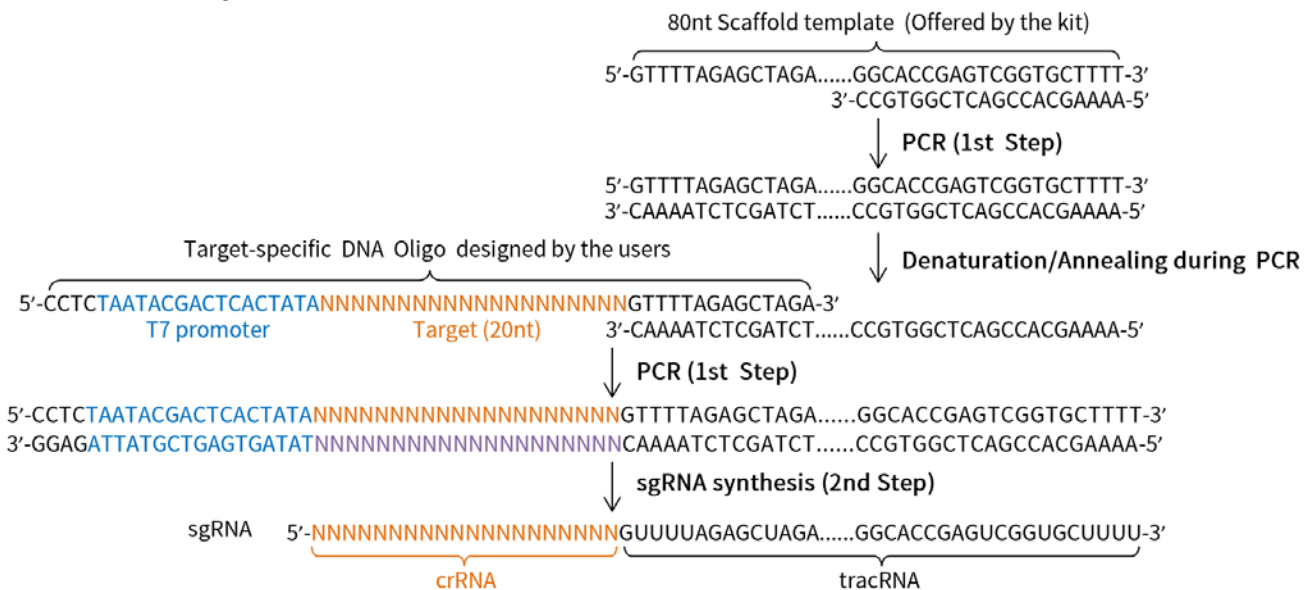


图1. 碧云天生产的BeyoCRISPR™ Two-Step sgRNA Synthesis Kit (D7083)合成sgRNA的原理图。

- 碧云天生产的BeyoCRISPR™ One-Step sgRNA Synthesis Kit (D7081)和BeyoCRISPR™ Two-Step sgRNA Synthesis Kit (D7083)的主要差别在于一步法操作简单仅需一步反应，但产量仅为两步法的约一半；两步法操作略复杂，但每个反应的产量比一步法多约1倍。
- 碧云天生产的BeyoCRISPR™ Two-Step sgRNA Synthesis Kit合成sgRNA的效果请参考图2。

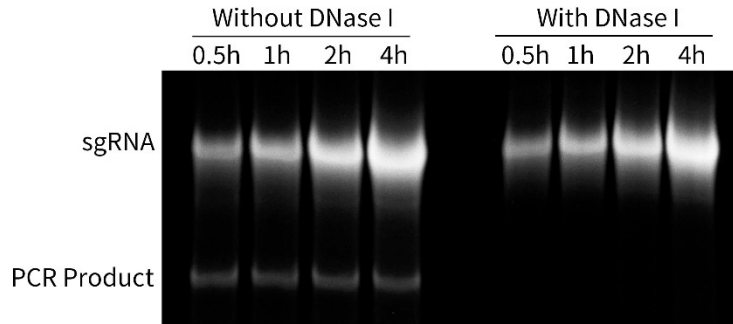


图2. 碧云天生产的BeyoCRISPR™ Two-Step sgRNA Synthesis Kit (D7083)合成sgRNA的效果图。参考本试剂盒的使用说明设置20μl PCR反应体系并进行PCR反应。参考本试剂盒的使用说明，设置20μl转录反应体系，37℃分别孵育0.5h, 1h, 2h, 4h, 70℃孵育10min以终止反应。取出5μl反应液，加入1μl DNA上样缓冲液(6X) (D0071)作为模板消化前的样品；另外取出5μl反应液，加入1μl DNase I, 37℃孵育15min以消化DNA模板，加入1μl DNA上样缓冲液(6X) (D0071)作为消化模板后的样品。将模板消化前后的样品进行15%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，电泳结束后使用D0130 NA-Red (EB升级换代产品)室温染色15min，使用凝胶成像系统观察实验结果。如图所示，使用本试剂盒可以很好地合成sgRNA，并且在图中所示的反应时间内，反应时间越长，合成的sgRNA的产量越高。不同实验条件产生的效果可能有所不同，图中效果仅供参考。

- 碧云天生产的BeyoCRISPR™ Two-Step sgRNA Synthesis Kit合成的sgRNA引导Cas9核酸酶切割目的序列的效果请参考图3。

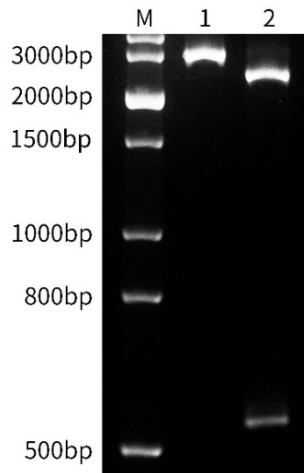


图3. 碧云天生产的BeyoCRISPR™ Two-Step sgRNA Synthesis Kit (D7083)合成的sgRNA引导Cas9核酸酶切割目的基因的效果图。设置27μl反应体系，其中包含1X Cas9 Reaction Buffer, 30nM sgRNA, 30nM Cas9 Nuclease (SpCas9) (D0511), 25℃孵育10min使sgRNA与Cas9 Nuclease充分结合。随后加入3μl底物DNA (3nM final), 混合均匀，37℃孵育15min进行切割反应。随后加入1μl Proteinase K (Proteinase K, ST533), 混合均匀，室温孵育10min以降解反应体系中的蛋白酶。取出10μl反应液，加入2μl DNA上样缓冲液(6X) (D0071)进行琼脂糖凝胶(1.5%)电泳，电泳结束后使用D0130 NA-Red (EB升级换代产品)室温染色15min，并使用凝胶成像系统观察实验结果。泳道1：反应体系中没有加入sgRNA，DNA片段大小为2773bp；泳道2：反应体系中加入了sgRNA，切割产生的DNA片段大小分别为2206bp和567bp。如图所示，使用本试剂盒合成的sgRNA可以有效引导Cas9 Nuclease充分切割目的DNA。不同实验条件产生的效果可能有所不同，图中效果仅供参考。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D7083S-1	Template Mix (2X)	200μl
D7083S-2	BeyoFusion™ DNA polymerase	11μl
D7083S-3	sgRNA Synthesis Buffer (2X)	200μl
D7083S-4	RNase Inhibitor (40U/μl)	20μl
D7083S-5	T7 RNA Polymerase	20μl
D7083S-6	DNase I	40μl
D7083S-7	Ultrapure Water	400μl

—	说明书	1份
产品编号	产品名称	包装
D7083M-1	Template Mix (2X)	1ml
D7083M-2	BeyoFusion™ DNA polymerase	55µl
D7083M-3	sgRNA Synthesis Buffer (2X)	1ml
D7083M-4	RNase Inhibitor (40U/µl)	100µl
D7083M-5	T7 RNA Polymerase	100µl
D7083M-6	DNase I	200µl
D7083M-7	Ultrapure Water	2ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存, 至少一年有效。

注意事项:

- 酶使用时宜存放在冰盒内或冰浴上, 使用完毕后宜立即放置于-20°C保存。
- 严格使用RNase Free的实验器材(如吸头、离心管、PCR管等), 并在操作过程中严格注意避免RNase污染。
- 需要自备的主要试剂: 3M NaAc (pH5.2); 无水乙醇; 70%乙醇; 1:1水饱和苯酚/氯仿混合溶液。如需更多的Ultrapure Water, 推荐选购碧云天的ST876 BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 靶DNA序列的选择和PCR上游引物(即Target-specific DNA oligo)的设计与合成。

- 靶DNA序列的选择。选择的靶DNA序列需要满足如下2个条件。以pUCm-T载体(D2006)作为基因编辑的靶基因为例展示的对于靶DNA序列的选择请参见图4。
 - 选择的靶DNA序列的3'端必须紧邻着PAM序列(NGG)。只有PAM序列上游的20nt DNA序列才能被选择用于CRISPR/Cas9系统的靶序列。
 - 任何紧邻着PAM序列(NGG)的靶序列都可被选用。但为了降低切割时的脱靶概率, 整个靶序列(包括PAM序列)与其它任何靶DNA序列之外的基因组DNA序列至少有三个错配碱基。如果错配碱基出现在PAM序列或紧邻着PAM序列, 会降低脱靶效应的几率。

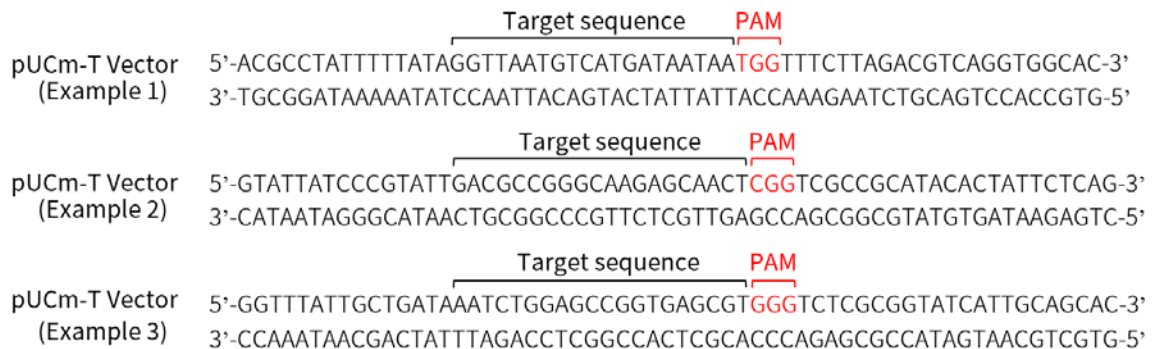


图4. 基于CRISPR/Cas9系统的基因编辑靶DNA序列的选择示例。以碧云天的pUCm-T载体(D2006)作为基因编辑的靶基因为例展示对于靶DNA序列的选择。

- PCR上游引物(即Target-specific DNA oligo)的设计与合成。PCR上游引物必须包括如下的4部分序。(a).引物的5'端为T7启动子序列(17nt)加额外的四个保护碱基(4nt)。(b).转录起始位点0~2个G。添加的G的个数依赖于靶序列的5'端。T7启动子至少需要两个G才能有效转录。如果选择的靶序列已经包含2个G, 就不需要在转录起始位点添加额外的G。如果包含1个或0个G, 就需要相应增加1个或2个额外的G。超过2个G会降低切割效率。(c).20nt长度的sgRNA靶序列。(d).引物3'端14nt长度的Scaffold Template退火序列。以pUCm-T载体(D2006)作为基因编辑的靶基因为例展示的PCR上游引物设计请参见图5。

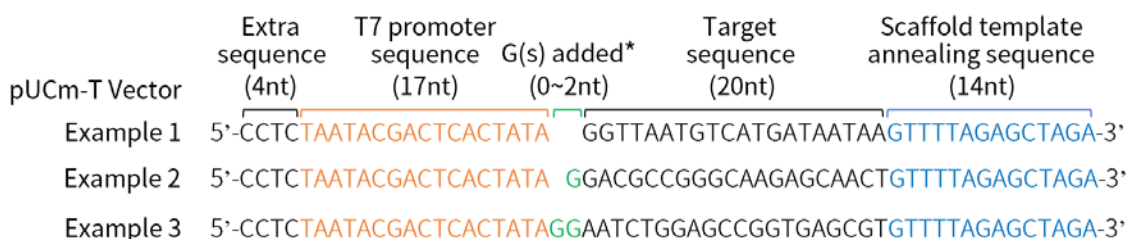


图5. BeyoCRISPR™ Two-Step sgRNA Synthesis Kit (D7083)所需PCR上游引物(即Target-specific DNA oligo)的设计示例。以碧云天的pUCm-T载体(D2006)作为基因编辑的靶基因为例展示设计的PCR上游引物(即Target-specific DNA oligo)序列。

2. PCR扩增合成sgRNA转录所需DNA模板。

- 溶解PCR反应所需的各种溶液。
- 参考下表在冰浴上配制PCR反应体系。如果有多个类似的PCR反应，可以先把下表中除了自行设计合成的Target-specific DNA Oligo之外的所有组分提前预混合，然后分装到各PCR反应管内，再在各管内加入Target-specific DNA Oligo。

Reagent	Volume
Template Mix (2X)	10µl
Target-specific DNA Oligo (10µM)	1µl
Ultrapure Water	8.5µl
BeyoFusion™ DNA Polymerase	0.5µl
Total Volume	20µl

注：由于此步骤产生的PCR产物后续要作为模板产生sgRNA，所以需要严格按照RNA操作的规范进行，避免RNase污染，相关试剂和耗材需要确保是RNase free的，或者是经过DEPC处理已经去除RNase的。

- 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀，室温离心数秒，使液体积聚于管底。
- 如果PCR仪没有热盖，则在PCR管内滴入一滴矿物油(mineral oil, ST275)。
- 将设置好的PCR反应管置于PCR仪上，开始PCR反应。PCR反应参数的设置可以参考如下表格。

PCR Step	Temperature	Time	Cycles
STEP1 (Initial Denaturation)	92°C	3min	1
STEP2 (Denaturation)	92°C	30s	30
STEP3 (Annealing)	55°C	30s	
STEP4 (Extension)	68°C	30s	
STEP5 (Final Extension)	68°C	10min	1
STEP6 (Hold)	4°C	forever	-

- PCR反应结束后，可以取约3-5µl PCR产物用于2%或3%的DNA琼脂糖凝胶电泳分析。检测PCR扩增产物条带的单一性和大致产量。如果条带比较单一，产量也符合预期(预期20µl PCR产物中约含有8µg模板DNA)，就可以进行后续步骤了。如果产量略偏低，后续的sgRNA的产量也会相应下降。

3. 体外转录获得sgRNA。

- 溶解并混匀转录反应所需的各种溶液，将T7 RNA polymerase置于冰浴上或冰盒内。
- 参考下表在冰浴上配制如下转录反应体系。如果同时进行多个转录反应，可以把下表中除sgRNA Template之外的所有组分提前预混合，然后分装到各反应管内，再在各管内加入sgRNA Template。

Reagent	Volume
sgRNA Synthesis Buffer (2X)	10µl
sgRNA Template (PCR Product)	5µl
RNase Inhibitor (40U/µl)	1µl
T7 RNA Polymerase	1µl
Ultrapure Water	3µl
Total Volume	20µl

注：由于涉及RNA操作，需要严格按照RNA操作的规范进行，避免RNase污染，相关试剂和耗材需要确保是RNase free的，或者是经过DEPC处理已经去除RNase的。可以适当通过按比例放大反应体系，以获得更多的sgRNA产量。放大反应体系对sgRNA的得率基本没有影响。

- 按照上表配制好反应体系后，轻轻混匀(可以用移液器吹打混匀或用Vortex在最低速度轻轻混匀)，瞬时离心。
- 反应条件：37°C孵育0.5~4h。通常反应时间越长，生成的sgRNA越多。
- 终止反应：70°C孵育10min以终止反应。

4. sgRNA的纯化。

- 取20µl转录反应产物，加入2µl DNase I，37°C孵育15min以充分降解DNA模板。
- 后续推荐使用如下的酚氯仿抽和乙醇沉淀方法进行sgRNA的纯化。也可以使用碧云天生产的R0028 RNAeasy™动物小RNA抽提试剂盒(离心柱式)进行sgRNA的纯化，但该试剂盒每个纯化柱的抽提容量相对较小一点，不能满足10-40µg sgRNA的纯化要求，但可以用于少量sgRNA快速纯化和分析鉴定。
- 在上述反应体系中加入160µl Ultrapure Water，再加入20µl 3M NaAc, pH5.2 (约200µl最终体积的1/10体积)，混匀。
- 加入200µl水饱和酚/氯仿混合溶液(等体积)，充分Vortex混匀以变性蛋白。
- 4°C 12000-14000g离心10min。收集上层液体至新的1.5ml离心管(Nuclease free)，加入2倍体积无水乙醇，混匀，-20°C沉淀3h或-80°C沉淀1h(如果想得到更高产量的sgRNA，可以考虑沉淀过夜)。

- f. 4°C 12000-14000g离心10min。去除上清，加入1ml 70%乙醇。
- g. 4°C 12000-14000g离心5min。去除上清，尽量洗净残留液体，打开管盖，室温放置2-5min挥发残留乙醇。
- h. 加入20µl Ultrapure Water溶解沉淀，-80°C冻存。sgRNA的浓度可以通过测定紫外吸收，以及通过电泳染色进行确定。通常一个反应体系可以获得约10-40µg sgRNA。

5. (选做) 所设计的sgRNA的效果鉴定。

- a. 参考下表在冰浴上配制如下反应体系。D0511 Cas9 Nuclease (SpCas9)可以向碧云天购买。

Reagent	Volume
Ultrapure water	20µl
Cas9 Reaction Buffer (10X)	3µl
1µM Cas9 Nuclease (SpCas9) (D0511)	1µl
300nM sgRNA	3µl (30nM final)
Volume	27µl
Pre-incubate for 10min at 25°C	
30nM substrate DNA	3µl (3nM final)
Total volume	30µl

- b. 反应条件：37°C孵育15min。反应时间也可以根据具体的实验目的适当延长至例如30-120min。
- c. 终止反应：加入1µl Proteinase K (Proteinase K, ST533)，混匀，室温孵育10min。
- d. 电泳检测：取出10µl反应液，加入2µl DNA上样缓冲液(6X) (D0071)进行琼脂糖凝胶电泳，电泳结束后使用D0130 NA-Red (EB升级换代产品)室温染色15min，并使用凝胶成像系统观察实验结果。
- e. 结果分析：对于设计的不同的sgRNA，可以根据电泳结果中对于底物DNA的切割效率判定sgRNA的设计效果。

常见问题：

- sgRNA获得量低。
 - 模板DNA质量问题：DNA中残留的乙醇、酚、氯仿等有机溶剂会影响转录效率。解决方法：重新制备高纯度的DNA模板。
 - RNA酶污染：RNA酶可以由模板DNA或者操作中带入。RNA酶会降解转录产物，从而使获得的sgRNA量减少。
 - 模板DNA量不足：每个sgRNA转录体系需要约2µg DNA模板。转录前需要定量DNA模板并且电泳检测是否条带单一、清晰。使用更大量的DNA模板对于提高sgRNA产量有一定帮助。
- sgRNA电泳条带模糊、两条带、大小不正确。sgRNA为100nt左右的单链RNA。在水溶液中容易形成二级结构。因此电泳时位置会发生变化。采用变性后快速冷却处理或者甲酰胺变性凝胶电泳可以显著改善电泳效果。
- sgRNA变性琼脂糖凝胶电泳出现显著小于100nt的弥散带。RNA酶污染造成sgRNA降解。解决方法：采用高质量的无核酸酶酶污染的耗材进行实验。实验过程中注意防止核酸酶污染。

参考文献：

- Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. Cell. 2014.156(5):935-49.
- Marangi M, Pistritto G. Front Pharmacol. 2018. 9:396.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
D7081S	BeyoCRISPR™ One-Step sgRNA Synthesis Kit	20次
D7081M	BeyoCRISPR™ One-Step sgRNA Synthesis Kit	100次
D7083S	BeyoCRISPR™ Two-Step sgRNA Synthesis Kit	20次
D7083M	BeyoCRISPR™ Two-Step sgRNA Synthesis Kit	100次
D0511S	Cas9 Nuclease (SpCas9)	50pmol
D0511M	Cas9 Nuclease (SpCas9)	250pmol
D0511L	Cas9 Nuclease (SpCas9)	1000pmol
D0508S	基因组编辑突变检测试剂盒	25次
D0508M	基因组编辑突变检测试剂盒	100次
D7080S	T7 Endonuclease I (CRISPR等基因突变鉴定用)	250U
D7080M	T7 Endonuclease I (CRISPR等基因突变鉴定用)	1250U
D7080L	T7 Endonuclease I (CRISPR等基因突变鉴定用)	5000U
D7062	SP6 RNA Polymerase	500U
D7066	T3 RNA Polymerase	500U
D7069	T7 RNA Polymerase	1000U
R0102-2kU	RNase Inhibitor	2000U

R0102-10kU	RNase Inhibitor	10000U
R0102-50kU	RNase Inhibitor	50000U
D7073	DNase I	200U
D7076	DNase I	1000U
ST532	Proteinase K (20mg/ml)	0.2ml
ST533	Proteinase K (20mg/ml)	1ml
ST876-100ml	BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)	100ml
ST876-500ml	BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)	500ml

Version 2022.05.03