

sgRNA体外转录试剂盒

产品名称	sgRNA体外转录试剂盒
公司名称	重庆英茂盛业生物科技有限公司
价格	.00/件
规格参数	
公司地址	重庆市江北区港桥支路4号7-2
联系电话	023-67630383 18111099640

产品详情

sgRNA体外转录试剂盒（V1.3）

产品简介：

sgRNA体外转录试剂盒采用T7 RNA聚合酶复合物高效转录spCas9sgRNA。试剂盒中的反应体系根据sgRNA特点进行优化，每个反应可在4小时内获得多达100-200ug的sgRNA。sgRNA可直接用Cas9蛋白体外切割，纯化后可用于细胞注射等实验。

试剂盒中配备了合成sgRNA转录模板，sgRNA转录所需的全部试剂，用户仅需要合成含有1条CRISPR靶点的引物就能完成sgRNA体外转录。

产品内容：

储存条件：-20 冻存

使用前必读注意事项：！务必使用无RNA酶的枪头、离心管配制转录反应体系。

1、制备转录模板 1.1 设计PCR正向引物：

spCas9识别的靶点为20nt+NGG共23个碱基序列，我们以阳性对照的靶点序列为例说明设计引物的方法。

阳性对照的靶点序列为：5'CTGCTAATCCTGTTACCAAGTGG-3'

需要合成的正向引物序列为：5'TTAATACGACTCACTATAGGGCTGCTAATCCTGTTACCAAG
GTTTTAGAGCTAGAAATA -3'

1.2 PCR扩增转录模板 反应体系：

正向引物 (10 uM)	0.8 μ l
SG-R primer	0.8 μ l
PCR template DNA	0.5 μ l
2 X PCR Mix	10 μ l
H2O	7.9 μ l

阳性对照反应：

Positive control Primer (10 uM)	0.8 μ l
SG-R primer	0.8 μ l
PCR template DNA	0.5 μ l
2 X PCR Mix	10 μ l
H2O	7.9 μ l

反应条件：95 5min 95 30sec 56 30sec 35 cycles 72 30sec

扩增产物为117bp。扩增完成后用2%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

2、sgRNA转录 操作过程中采用无RNA酶的吸头及离心管操作，并注意避免RNA酶污染。

2.1 转录反应 按顺序加入以下反应物：（1）反应体系:

无RNA酶水	to 20 μ l
5 X Transcription Buffer	4 μ l
NTP mix	8 μ l
PCR产物	2 μ l
T7 Transcription Enzyme mix	2 μ l

*20ul体系sgRNA产量为100-200ug。如果下游实验所需sgRNA量较少，可以根据需要适当调整体系，但尽量不低于5ul。

（2）转录条件：充分混匀，37 孵育4小时。

*孵育时尽量采用PCR仪等带有热盖的仪器，或者在37 恒温培养箱反应。切勿使用水浴锅。

（3）转录完成后取少量反应液，稀释20倍后用琼脂糖凝胶电泳检测产物大小及完整性。

电泳方法：(1)

取1 μ l转录产物，加入19 μ l无RNA酶水，混匀（稀释20倍）。(2)取3 μ l稀释后样品，加入3 μ l 2 X RNA

Loading Buffer。70 加热10min，立即放置冰上。

(3)用2%琼脂糖凝胶电泳检测条带。

3、转录产物纯化 * 转录产物可以直接用于Cas9体外酶切反应。纯化步骤选做。 *

转录模板DNA对Cas9体外酶切没有影响，可以不用去除。如果要去除模板DNA，可以先用DNase I消化转录反应液，再进行纯化。 * 可以选用可靠公司生产的RNA纯化试剂盒进行纯化或者乙醇沉淀纯化。乙醇沉淀纯化方法见电子版说明书。

4、RNA定量 转录得到的sgRNA可以采用紫外分光光度计定量。一般20 μ l体系可以得到sgRNA 100~200ug

相关产品：

[Cas9体外酶切试剂盒](#)

[货号：PC1400](#)

[Cas9-NLS蛋白](#)

[货号：PC1350](#)

关注微信公众号输入货号（PC1380）即可下载电子版说明书：