

## sgRNA 使用说明书

### 产品简介

sgRNA 采用酶促法合成，长度通常为 100nt，与 Cas9 蛋白组合后通过电转或化学转染试剂转染到细胞内，进行基因编辑实验。

### 运输与保存

产品以冻干粉的形式带冰袋运输。收到产品后，请于-20°C~-80°C保存，冻干粉可以稳定保存一年。使用前请瞬时离心，用 RNase-free H<sub>2</sub>O 或 TE buffer 配制 100μM（参照下表）储存液，分装保存，避免反复冻融。

表 1 100μM 储存液的配制参考

产品量	1.5nmol	5nmol	10nmol
RNase-free H <sub>2</sub> O	15μl	50μl	100μl

### 注意事项

- 1) 由于冻干粉呈很轻的薄膜附在管壁，使用前瞬时离心，防止散失。对于配制好的 sgRNA 溶液建议分装后储存与-20°C，长期保存请置于-80°C。
- 2) 为避免外界因素（酶，pH 或者温度等）导致产品降解，请严格遵循 RNA 操作要求。
- 3) 转染效率主要为细胞性质及转染方法所决定，需要对具体实验细胞选择合适的转染方法。
- 4) 使用过程请佩戴一次性手套。

### 细胞实验方法（CRISPR RNP 脂质体转染法）

- 1、细胞提前铺板，待细胞密度达到 45%-55%，即可进行转染操作。

细胞接种数目以生长速率为基础，快速生长的细胞转染前需接种较少的细胞，以转染时观察确定细胞密度为准。

- 2、转染使用 Lipofectamine 3000 Transfection Kit（Thermo Fisher），分为体系 A 和体系 B，两部分分别配制，之后将二者混合后进行转染。

体系 A：Opti-MEM™ I Medium、NLS-Cas9 Nuclease、sgRNA、Cas9 Plus™ Reagent，涡旋震荡混匀 3s，室温 4000rpm 离心 3s，室温静置 5min。

体系 B：Opti-MEM™ I Medium、CRISPRMAX™ Reagent，涡旋震荡混匀 3s，室温 4000rpm 离心 3s。

体系 B 配制完成后，无需孵育，为获得最佳转染效率，稀释后的 CRISPRMAX™试剂放置时间不要超过 3 分钟。

- 3、用移液器将吸取全部体系 A 加入至体系 B 中，涡旋震荡混匀 3s，室温 4000rpm 瞬时离心 3s，室温静置孵育 10min。

此步骤孵育时间应控制在 20min 以内。

- 4、从恒温培养箱中取出细胞长至合适密度的 24 孔板或者 6 孔板，将步骤（3）孵育后的复合物体系轻轻

滴加到培养基中，8 字均匀摇晃 5 次后，放入恒温培养箱 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养。

5、培养 48h 后，收集细胞进行敲除效率分析。

复合物体系滴加到培养基中，24 小时后观察细胞状态，若培养基溶液变黄，或细胞状态较差，可用新鲜的预热过的细胞完全培养基替换原先的细胞转染培养基，继续培养，再培养 24h 后，收集细胞。

### 常见编辑效率低的原因及解决方法

1、sgRNA 效率低或储存时间过长

在进行实验前，建议通过 T7E1 酶切法来确定 sgRNA 的编辑效率，选取编辑效率高的 sgRNA 进行后续实验，若所设计的 sgRNA 效率都无法达到要求，则需要重新进行 sgRNA 设计。

2、sgRNA 溶液储存时间过长或反复冻融

sgRNA 配制成溶液后需保存在 -20°C ~ -80°C 中。如需多次使用，建议分装后保存；如需长时间储存，建议置于 -80°C。若 sgRNA 超过 6 个月，建议重新合成 sgRNA。

3、供体 DNA 同源臂过短

同源臂的长度与插入基因的长度有关，大片段的插入建议加长同源臂的长度。

4、转染失败，存活细胞数量很少

请根据具体细胞选择合适的转染方式，若细胞状态差，则不建议进行转染，重新培养细胞，在其活力及铺板密度均适宜的情况下再进行转染。

5、Cas9 蛋白及 sgRNA 的比例添加不合适

优化 Cas9 蛋白和 sgRNA 的添加比例，使用本产品进行脂质体转染 RNP 实验是，推荐使用浓度为：Cas9 蛋白 0.26μM，sgRNA 0.5μM。