

Ribo 基因编辑 mRNA 产品使用说明

RN: R11104.3

产品简介

锐博生物的基因编辑系列预制 mRNA 产品，包括 Cas9 mRNA、Cre mRNA 等，使用了 Ribo-Cap1 帽结构类似物以共转录的方式合成，具有完整的 mRNA 结构，包括 Cap1 帽子、ORF 序列，5'UTR 和 3'UTR 序列，以及 polyA 结构，且按哺乳动物的密码子偏好性等进行了 ORF 序列的优化，提高了 mRNA 的稳定性及翻译效率，可在细胞内或体内高效的表达出有活性的蛋白。部分基因编辑 mRNA 还使用了 N1-Me-pseudoU 修饰核苷酸，修饰核苷酸 N1-Me-pseudoU 的添加可以减少 mRNA 的先天免疫原性。

Cap1 Cas9 mRNA 可表达出带有核定位信号 (NLS) 的野生型 Cas9 蛋白，可用于 CRISPR/Cas9 系统介导的哺乳动物细胞的基因编辑。

Cap1 Cre mRNA 可表达出用于 Cre-Loxp 基因重组系统的 Cre 重组酶。

表 1 基因编辑 mRNA 产品信息

产品编号	mRNA	规格	浓度	体积	碱基修饰
C12001-1	Ribo Cap1 Cas9 mRNA	20 µg	1 µg/µL	20 µL	无
C12002-1	Ribo Cap1 Cas9 mRNA (N1-Me-pseudoU)	20 µg	1 µg/µL	20 µL	N1-Me-pseudoU
C12003-1	Ribo Cap1 Cre mRNA (N1-Me-pseudoU)	20 µg	1 µg/µL	20 µL	N1-Me-pseudoU

运输保存

产品为低温运输。

收到产品后，请于-80°C 保存，可以稳定保存半年，避免反复冻融（不超过 5 次）。

使用前须知

- 1) 为避免外界因素（包括酶，极端 pH 或者温度条件等）导致产品降解，所有操作需严格遵循 RNA 操作规则。实验过程中，产品最好于冰上放置，使用完毕后请于-80°C 小心保存。
- 2) 开盖前瞬时离心，轻柔开盖。
- 3) 首次使用时可根据后续使用计划对产品进行分装，每个分装管冻融不超过 5 次。
- 4) 使用过程请佩戴一次性手套等防护用品。
- 5) 本试剂仅供科研使用，不可用于体外诊断或治疗。

材料及仪器准备

- 1) 细胞转染系统，譬如 riboFECT mRNA Transfection Reagent (货号 C11055-1)，或者其它转染系统、递送系统、显微注射系统等，以及相关配套试剂。
- 2) 使用 Cap1 Cas9 mRNA 时需搭配 crRNA 及 tracrRNA，如 riboEDIT crRNA 和 riboEDIT tracrRNA (货号 crT00001)，或搭配 sgRNA 进行基因编辑实验。
- 3) 使用 Cap1 Cre mRNA 时需搭配 Loxp 系统进行基因重组。

实验方法

以下为 Ribo Cap1 Cas9 mRNA 搭配 riboEDIT crRNA 和 riboEDIT tracrRNA 并使用 riboFECT mRNA Transfection Reagent 进行转染的实验方法，可根据实际实验需求另行调整。使用其它转染试剂或转染系统进行转染时请参考具体转染试剂或转染体系的说明。Ribo Cap1 Cre mRNA 转染可根据具体实验需求并结合转染试剂说明确定实验方法。

1 实验准备

1.1 准备细胞：转染前 18-24 小时，取适量对数生长期细胞接种，实验前细胞密度达到 70%~90%为宜。

1.2 riboEDIT tracrRNA 和 riboEDIT crRNA 开封使用时，于 12000rpm 短暂离心，小心开盖沿管壁轻柔加入无酶水，5 nmol crRNA 或 tracrRNA 对应加入 50 μL 无酶水，于室温溶解半小时，并涡旋振荡数次促溶，制备成 100 μM 的储存溶液，并分装保存于 -80°C 。

注：使用已溶解好的 riboEDIT tracrRNA 及 riboEDIT crRNA 进行实验则跳过此步骤。

1.3 按当次实验所需取适量 riboEDIT tracrRNA 和 riboEDIT crRNA 储存液稀释为 10 μM 的工作液，置于冰上备用，现用现配。

1.4 RiboCap1 Cas9 mRNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 置于冰上备用。

2 转染

以下转染实验均以转染24孔板1个孔为例

2.1 取 25 μL Opti-MEM 减血清培养基 (Thermo Fisher Scientific 产品)，加入 2 μL riboFECT mRNA Transfection Reagent 转染试剂，轻柔混匀后室温孵育 10 分钟。

2.2 另取一份 25 μL Opti-MEM 减血清培养基，加入 0.5 μL Ribo Cap1 Cas9 mRNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)、1 μL tracrRNA (10 μM) 和 1 μL crRNA (10 μM)，混匀。

2.3 制备转染复合物，将 2.1 稀释的转染试剂溶液与 2.2 配制的 crRNA、tracrRNA、Cas9 mRNA 混合物混合到一起，室温孵育 5 分钟。

2.4 细胞培养基更换为 450 μL 新鲜完全培养基。

2.5 将 2.3 配制的转染复合物逐滴加入到含 450 μL 完全培养基的细胞中，轻轻混匀，继续培养 48~72 小时进行后续检测。

注：以上实验可参考表 2 Ribo Cap1 Ca9 mRNA 转染体系进行调整，必要时可另行优化。

表 2 Ribo Cap1 Ca9 mRNA 转染体系

组分	96-well	24-well	6-well
细胞培养基	90 μL	450 μL	2250 μL
转染前更换为指定体积的新鲜完全培养基			
Opti-MEM Medium	5 μL	25 μL	125 μL
riboFECT mRNA Transfection Reagent	0.4~0.6 μL	2~3 μL	10~15 μL
稀释的 riboFECT mRNA Transfection Reagent 置于室温孵育 10 分钟。			
Opti-MEM Medium	5 μL	25 μL	125 μL
Ribo Cap1 Cas9 mRNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0.05~0.2 μL	0.25~1 μL	1.25~5 μL
tracrRNA (10 μM)	0.2~0.8 μL	1~4 μL	5~20 μL
crRNA (10 μM)	0.2~0.8 μL	1~4 μL	5~20 μL
制备好后，与稀释的 riboFECT mRNA Transfection Reagent 混合，室温孵育 5 分钟，孵育结束后加入细胞中。			