注意事项

1.适用范围：本试剂盒适用于LentiCRISPRv2、LentiGuide-Puro及同类型核心骨架载体（限人U6启动子），其他骨架适配情况请咨询技术服务。

2.对照设置：建议每次反应设置Nuclease-free H_2O为阴性对照，以1 μL Positive Control A（Plasmid DNA）或10 μL Positive Control B（Genomic DNA）为阳性对照。

3.注意事项：第一步PCR后必须进行纯化，以去除引物二聚体和非特异性产物，否则会严重影响第二步接头的连接效率；第二步PCR的引物和循环数需自行优化，推荐使用高保真酶并严格控制循环数；若需混合多个样本测序，务必在第二步PCR中引入不同的Index序列。本试剂盒不提供Index引物，请用户自备或咨询技术服务。

试剂及耗材	推荐
Qubit dsDNA HS AssayKit	Vazyme，Cat. No. EQ121
PCR产物纯化试剂盒	Tiangen，Cat. No. DP214
第二步PCR所需接头引物	推荐直接送研美生物测序

常见问题及解决方法

常见问题	可能原因及解决方案
第一步PCR无条带	1.通用引物与骨架不匹配，确认骨架载体类型并设置阳性对照; 2.基因组未整合sgRNA，可重新制备文库细胞并设置阳性对照; 3.模板降解，制备高质量gDNA模板并设置阳性对照。
第一步PCR条带弱	1.模板用量不足，适当提高模板量; 2.扩增量不够，适当增加循环数至28。
阳性对照无条带或条带偏弱	1.PCR反应程序设置错误或PCR体系添加错误; 2.Master Mix或Positive Control失效，请确认存放方式和有效期; 3.循环数偏低，适当增加PCR循环数。
阴性对照有条带	1.怀疑环境污染，更换实验环境、使用带滤芯枪头; 2.扩增过度，适当减少PCR循环数。

研美生物
Making Science Easy

Magic™ 两步法CRISPR测序文库构建试剂盒

Two-step CRISPR NGS Library Construction Kit

（Cat. No.：PK203）

产品简介

本试剂盒适用于以LentiCRISPRv2、LentiGuide-Puro等为载体骨架（限人U6启动子）的文库sgRNA扩增，既可用于CRISPR文库质粒的NGS测序质控，也可对CRISPR筛选所得的细胞/组织样本进行NGS测序建库。试剂盒采用两步法策略：第一步使用通用引物对sgRNA区域进行特异性PCR扩增；第二步由用户根据自身测序平台（如Illumina、MGI）自行设计并添加含测序接头及Index的引物，通过第二轮PCR完成完整文库构建。该方案将sgRNA扩增与接头添加步骤分离，可灵活适配不同测序平台及Index组合。

产品内容

产品组成	PK203A (100 Preps)	PK203B (200 Preps)
Nuclease-free H_2O	3 mL	5 mL
Magic™ PCR Master Mix (2×)	3 mL	5 mL
Magic™ Universal Primer Mix (10 μM)	500 μL	1 mL
Positive Control A (Plasmid)	10 μL	10 μL
Positive Control B (Genomic DNA)	100 μL	100 μL

储存条件

请将试剂盒置于-20℃条件下保存；使用前，各组分需充分融解、震荡混匀和离心。

操作步骤

第一步PCR：sgRNA区域扩增

1.推荐使用Qubit检测各样本基因组DNA浓度，并分别计算每个样本1 μg基因组DNA所对应的体积；若模板为CRISPR文库质粒，建议添加100 ng。按表1配制PCR反应体系，按表2设置PCR反应程序。

表1.PCR反应体系

组分	体积（μL）
Magic™ PCR Master Mix（2×）	25
Magic™ Universal Primer Mix（10 μM）	4
Genomic DNA/ Library Plasmid[a]	x
Nuclease-free H_2O	21-x
Total	50[b]

a：模板为基因组DNA时，推荐添加量为1 μg（Qubit定量）或2 μg（Nanodrop定量）；模板为CRISPR文库质粒时，建议添加量为100 ng（Qubit）或200 ng（Nanodrop）。可根据样本实际情况适当调整添加量。

b：请根据CRISPR文库所包含的sgRNA数量，每1000条sgRNA配制4管50 μL PCR反应体系，可确保每条sgRNA获得约500×覆盖度，以保证测序覆盖度。

表2.PCR反应体系

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95℃	3 min	1
变性	95℃	15 s	25[a]
退火	58℃	15 s	
延伸	72℃	30 s	
补延伸	72℃	5 min	1

a：为避免过度扩增对文库质量造成影响，可酌情减少循环数；若扩增产物偏弱，可适当增加循环数。

2.PCR反应结束后，将同一样本的所有PCR产物合并收集于干净的1.5 mL离心管中，涡旋混匀后取少量进行1.5%琼脂糖凝胶电泳，检测目的条带是否扩增成功。注：目的条带大小约为176 bp，不同骨架载体扩增的条带大小可能存在一定差异，属正常现象。

3. 取200 μL混匀后的PCR产物进行PCR产物纯化，具体步骤请参考试剂盒说明书。

第二步PCR：添加测序接头及Index（用户自备）

本试剂盒不提供测序接头及Index引物，请用户根据所用测序平台（如Illumina、MGI等）自行设计或购买适配的接头引物。推荐将纯化后的第一步PCR产物直接送交研美生物完成后续加接头及测序服务。

推荐方案（以Illumina平台为例）：

1.取第一步纯化后的产物50 ng作为模板；

2.使用含有P5/P7序列及Index的引物进行第二轮PCR（建议10个循环）；

3.反应结束后纯化产物（磁珠或胶回收），将各样本文库产物等量混合后送测序。