

产品说明书

26 版

基本信息

产品编号:	PS2435
产品名称:	NLS-Cas9 Nuclease

产品简介:

CRISPR/Cas9 是细菌和古细菌在长期演化过程中形成的一种适应性免疫防御系统。CRISPR/Cas9 系统通过将入侵噬菌体和质粒 DNA 的片段整合到 CRISPR 序列中, 并利用相应的 CRISPRRNAs (crRNAs) 来指导 Cas9 蛋白对同源序列的降解, 从而提供免疫性。人工改造过的 Cas9/sgRNA 系统通过 sgRNA (short guide RNA) 引导 Cas9 蛋白识别并剪切带有 sgRNA 靶点的双链 DNA, 可用于基因敲除和精确编辑 DNA 等操作。

本产品源自 *Streptococcus pyogenes* (化脓性链球菌) 为 SpCas9 核酸内切酶, 采用大肠杆菌重组表达, 通过在蛋白 N 端加入核定位信号 (NLS), 可使蛋白进入细胞核内进行基因组编辑。本产品为纯蛋白体系, 避免 CRISPR 基因敲除时引入质粒或病毒干扰。

本产品主要应用于细胞基因编辑、体外筛选高效 gRNA 序列、特定双链 DNA 在 gRNA 引导下的剪切、含有特定序列双链 DNA 的选择性线性化等。

组分:

组分	组分名称	规格 (500pmol)	规格 (1000pmol)	保存条件
组分 A	NLS-Cas9 Nuclease (20 μ M)	25 μ L	50 μ L	-20 $^{\circ}$ C
组分 B	10 $\times$ Reaction Buffer	1mL	2mL	-20 $^{\circ}$ C

酶纯度: $\geq 95\%$
反温温度: 37 $^{\circ}$ C
酶保存液: 10 mM Tris, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50%甘油, pH7.4 at 25 $^{\circ}$ C。

操作步骤:

体外 DNA 裂解实验参考方法	
一: 溶解并混匀体外消化反应所需的各种溶液。	
1: 将 NLS-Cas9Nuclease、gRNA、底物 DNA 置于冰浴上, 使用无核酸酶水稀释 gRNA 至 300nM 底物 DNA 至 30nM。	
2: 用无核酸酶水稀释适量 10 $\times$ ReactionBuffer 至 1 $\times$ ReactionBuffer。NLS-Cas9Nuclease 20 μ M 推荐使用 1 $\times$ ReactionBuffer 稀释成浓度为 1 μ M 适量备用稀释后宜尽快使用, 不宜冻存后使用, 以避免反复冻融导致酶活性下降。	
二: 按照如下建议配制反应体系:	
组分	体积
Nuclease-free ddH ₂ O	20 μ L
10 $\times$ Reaction Buffer	3 μ L
sgRNA 300 nM)	3 μ L
NLS-Cas9 Nuclease (1 μ M)	1 μ L
Total	27 μ L
注意:	
为了保证最高的切割效率, NLS-Cas9Nuclease 和 sgRNA 与 targetDNA 的摩尔比例至少为 10:10:1 或者更高。	
一般使用 30 μ L 体系, 但也可以等比例放大。	



实验前请用 Nuclease-free ddH₂O 将 sgRNA 稀释到 300nM。

请佩戴口罩并使用 Nuclease-free 的耗材与试剂，避免实验过程 sgRNA 的降解。

三：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。25° C 预孵育 10min

4：加入 3 μL 30nM 底物 DNA (30 μL 最终体积)，轻轻混匀 (用移液器轻轻吹打混匀或用涡旋混合器在最低速度轻轻混匀)，随后离心沉淀液体 37° C 孵育 15min，反应时间可以根据实际情况适当延长至例如 30-120min。

5：每个样品中加入 1 μL 蛋白酶 K (20mg/mL)，轻轻混匀，室温孵育 10min。

6：每个反应体系中加入 6 μL DNA 上样缓冲液 (6X)，然后使用适当浓度的琼脂糖凝胶进行电泳分析。如果不立即电泳，可以加入 EDTA 终止反应或 -20° C 保存备用。通过体外的 Cas9 酶切实验，可以判断所设计的 gRNA 的效果是否理想或者优化筛选出理想的 gRNA 用于细胞或动物实验。

注意事项：

1：本产品使用时会涉及 gRNA 和 DNA 的操作，必须注意 RNase-free 和 DNase-free 的相关操作。所有自行准备的试剂和耗材也都应是 Nuclease-free 的。如果可能有核酸酶污染，可考虑用 0.01% 的 DEPC 处理过夜，然后高温高压处理后使用。

2：为了您的安全和健康，实验时请穿实验服并戴一次性手套操作。

储存：低温运输，-20° C 保存，24 个月。

