

Cas9 Nuclease (SpCas9)

产品编号	产品名称	包装
D0511S	Cas9 Nuclease (SpCas9)	50pmol
D0511M	Cas9 Nuclease(SpCas9)	250pmol
D0511L	Cas9 Nuclease (SpCas9)	1000pmol

产品简介:

- Cas9 Nuclease(SpCas9), 即CRISPR-associated endonuclease Cas9也称Csn1, 是碧云天自主研发的PerfectProtein™技术平台表达、纯化获得的一种来源于 *Streptococcus pyogenes*, 能在gRNA引导下序列特异性地切割双链DNA的核酸内切酶。本产品可以用于体外筛选高效的guide RNA (gRNA)序列、特定DNA序列在gRNA引导下的剪切、含有特定序列的双链环形DNA的线性化等用途。
- CRISPR/Cas9是一项突破性的基因组编辑技术, 操作便捷, 应用广泛。CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)是一种原核生物利用RNA引导的DNA核酸酶Cas9对外源的噬菌体或病毒核酸进行基因沉默的获得性免疫系统(adaptive immune system), 后续在此基础上逐渐发展为广泛应用于原核和真核生物的越来越成熟的基因编辑技术。该技术能够在gRNA引导下通过Cas9对原核和真核生物的基因组DNA的靶向序列进行位点特异性的切割, 然后通过易错修复(error-prone repair)或同源重组(homologous recombination)在切割位点改变或插入序列来产生移码突变, 从而实现基因敲除。其中gRNA确保识别位点的特异性。随着CRISPR技术的发展, 该技术目前不仅可以实现基因敲除, 还可以实现基因的点突变、插入突变等多种突变方式, 特别是在临床应用方面可以用于修复不良突变等[1, 2]。同时通过构建没有内切酶活性的Cas9突变体dCas9, 通过与dCas9直接融合表达或间接招募转录激活或转录抑制因子, 可以实现sgRNA靶向基因的转录激活或转录抑制。
- CRISPR/Cas9系统由Cas9 Nuclease和gRNA复合物所组成。gRNA, 也称sgRNA (single guide RNA), 由18-20bp与靶基因序列互补的CRISPR RNA (crRNA)序列以及能与Cas9特异性结合的trans-activating crRNA (tracrRNA)序列组成。gRNA通过与靶序列之间的互补配对, 将Cas9 Nuclease引导至靶DNA, Cas9 Nuclease C端的与PAM (proto-spacer adjacent motif)相互作用的结构域(PAM-interacting domain)识别富含G碱基(5' -NGG-3')的PAM序列, 在HNH和RuvC两个结构域的协同作用下, 在PAM序列NGG上游大约三个碱基处产生DNA的双链断裂(Double-strand break, DSB)。如果该双链DNA断裂发生在细胞内, 在细胞DNA修复过程中会导致基因靶位点处的插入、删除或替换, 从而可能产生移码突变, 导致目的基因的缺失突变(图1)[1]。

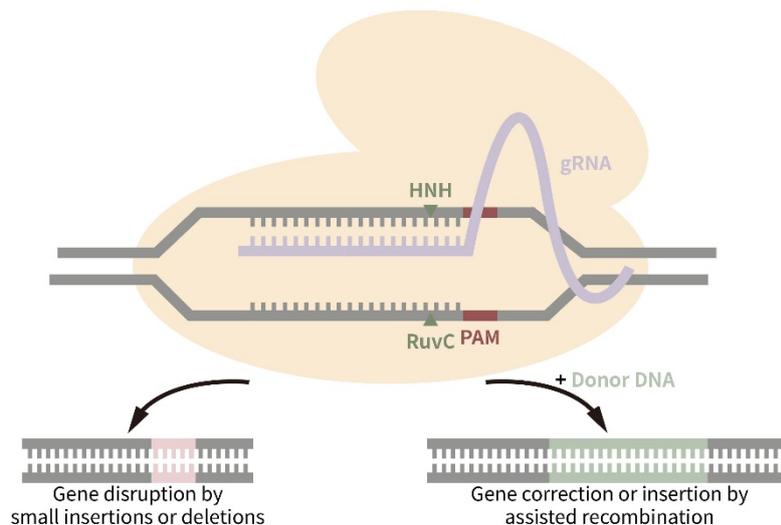


图1. 碧云天Cas9 Nuclease基因编辑示意图。

- 碧云天生产的Cas9 Nuclease酶活性效果请参考图2。

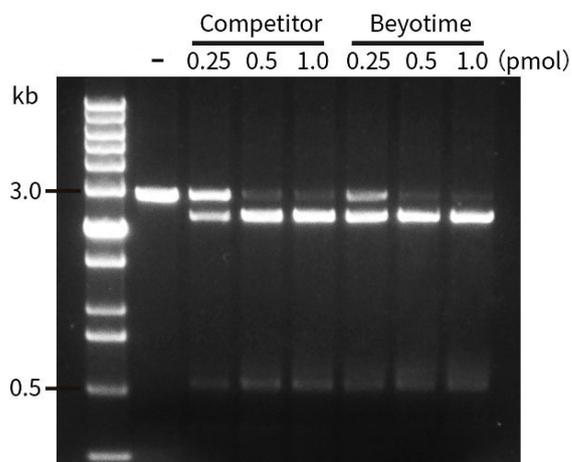


图2.碧云天生产的Cas9 Nuclease酶活性的效果图。反应体系：20 μ l水、3 μ l Cas9 Reaction Buffer(10X)、3 μ l 300nM gRNA(Target sequence: 5'-GGTTAATGTCATGATAATAA-3')、1 μ l Cas9(分别为0.25、0.5、1.0pmol), 25 $^{\circ}$ C预孵育10min。然后加入3 μ l 30nM的pUCm-T(D2006)线性化质粒, 37 $^{\circ}$ C孵育15min; 然后加入1 μ l蛋白酶K(Proteinase K, ST533), 室温孵育10min以终止反应; 最后加入6 μ l DNA上样缓冲液(6X) (D0071), 进行电泳检测。gRNA与Cas9结合后, 引导后者至pUCm-T与gRNA互补的序列酶切产生2206bp和567bp的片段。如图2所示, 本产品与N公司(Competitor)的Cas9 Nuclease具有相当的酶活性。实际效果会因样品种类、检测条件等的不同而存在差异, 本图仅供参考。

- **来源:** 通过 *E.coli* 重组、表达、纯化而获得, 表达基因来源于 *Streptococcus pyogenes*。
- **用途:** 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。
- **纯度:** 不含DNA外切酶, 不含非gRNA依赖的DNA内切酶, 不含RNA酶。
- **浓度:** 1 μ M(158ng/ μ l)。
- **酶储存溶液:** 10mM Tris, 300mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 50% (v/v) Glycerol, pH7.4 @25 $^{\circ}$ C。
- **Cas9 Reaction Buffer(10X):** 500mM Tris-HCl, 1M NaCl, 100mM MgCl₂, 1mg/ml BSA, pH7.9@25 $^{\circ}$ C。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D0511S-1	Cas9 Nuclease (1 μ M)	50 μ l
D0511S-2	Cas9 Reaction Buffer(10X)	0.2ml
-	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D0511M-1	Cas9 Nuclease (1 μ M)	250 μ l
D0511M-2	Cas9 Reaction Buffer(10X)	1ml
-	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D0511L-1	Cas9 Nuclease (1 μ M)	1ml
D0511L-2	Cas9 Reaction Buffer(10X)	4ml
-	说明书	1份

保存条件:

-20 $^{\circ}$ C保存, 至少一年有效。可以分装后在-80 $^{\circ}$ C长期保存。

注意事项:

- 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。操作时建议戴一次性口罩操作。
- 对于操作环境中核酸酶的去除, 推荐使用碧云天生产的RNase and DNase Away (R0123)以去除实验桌、仪器设备等表面或其它接触面上的核酸酶。反应体系中推荐加入RNase Inhibitor以保护RNA不被降解。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 溶解并混匀体外消化反应所需的各种溶液。将Cas9 Nuclease、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. 按照下表配制反应体系(以30μl体系为例):

Reagent	Volume
Nuclease-free Water	20μl
Cas9 Reaction Buffer(10X)	3μl
gRNA (300nM)	3μl
Cas9 Nuclease(1μM)	1μl
Total Reaction Volume	27μl

3. 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3μl30nM底物靶DNA(30μl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1μl蛋白酶K(ST532)，轻轻混匀，室温孵育10min。

6. 每个反应体系中加入6μl DNA上样缓冲液(6X)(D0071)，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-20°C保存备用。

常见问题:

1. 为什么观察到目的DNA切割不完全?

- 可能是由于Cas9 Nuclease、sgRNA、target DNA的比例不合适引起的，推荐Cas9 Nuclease、sgRNA、target DNA的摩尔比例至少为10:10:1。也可以通过适当延长反应时间使反应更加充分。
- 可能与sgRNA的序列有关，可以根据target DNA选择更合适的sgRNA序列，不同的sgRNA的效果会差别比较大。
- 可能由于sgRNA降解引起的，可以通过凝胶电泳验证sgRNA的完整性。

参考文献:

- Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. Cell. 2014.156(5):935-49.
- Marangi M, Pistritto G. Front Pharmacol. 2018. 9:396.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D0508S	基因组编辑突变检测试剂盒	25次
D0508M	基因组编辑突变检测试剂盒	100次
D7080S	T7 Endonuclease I (CRISPR等基因突变鉴定用)	250U
D7080M	T7 Endonuclease I (CRISPR等基因突变鉴定用)	1250U
D7080L	T7 Endonuclease I (CRISPR等基因突变鉴定用)	5000U
ST532	Proteinase K (20mg/ml)	0.2ml
R0123	RNase and DNase Away	250ml
R0102-2kU	RNase Inhibitor	2000U
R0102-10kU	RNase Inhibitor	10000U
R0102-50kU	RNase Inhibitor	50000U
D0509S	Cre Recombinase	50U
D0509M	Cre Recombinase	250U
D0509L	Cre Recombinase	1000U
ST876-100ml	BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)	100ml
ST876-500ml	BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)	500ml
D7062	SP6 RNA Polymerase	500U
D7066	T3 RNA Polymerase	500U
D7069	T7 RNA Polymerase	1000U
D7383	NTP set (100mM each, Nuclease free)	4×250μl
D0510	FnCas12a(Cpf1)	70pmol

Version 2022.05.06