

Cas9 Nickase (D10A) NLS

产品编号	产品名称	包装
D0514S	Cas9 Nickase (D10A) NLS	100pmol
D0514M	Cas9 Nickase (D10A) NLS	500pmol

产品简介:

- Cas9 Nickase (D10A) NLS, 即Cas9缺刻酶(D10A) NLS, 是碧云天自主研发的PerfectProtein™技术平台表达、纯化获得的一种含核定位信号(Nuclear localization signal or nuclear localization sequence, NLS), 能在gRNA引导下序列特异性地切割单链DNA的核酸内切酶。
- Cas9 Nickase (D10A) NLS是通过对Cas9核酸酶的RuvC结构域内的单个氨基酸突变产生的D10A突变体。与野生型的Cas9核酸酶一样, Cas9 Nickase (D10A) NLS利用gRNA靶向目标DNA序列, 但是与切割双链的野生型不同, 由于RuvC结构域的突变, Cas9 Nickase (D10A) NLS仅仅切割与gRNA互补的DNA链(图1) [1]。

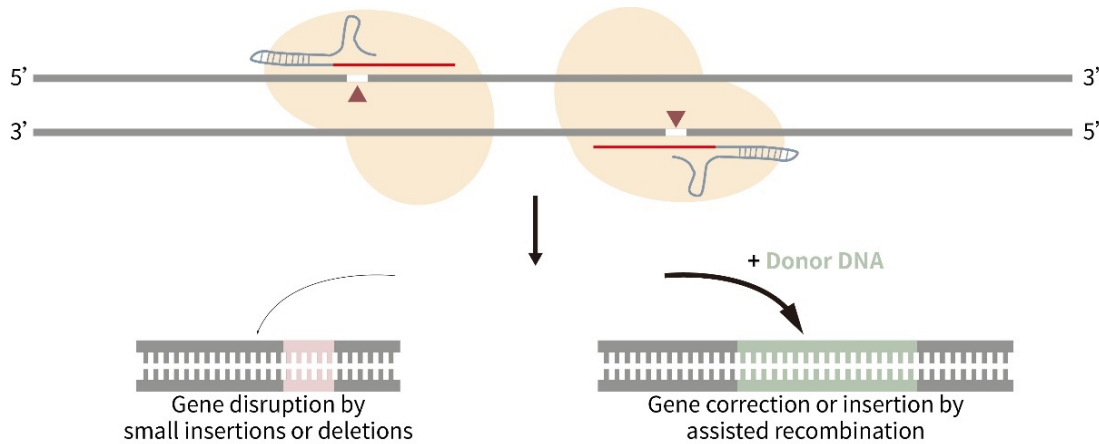


图1. 碧云天Cas9 Nickase (D10A) NLS (D0514)基因编辑示意图。

- **本产品脱靶率低, 特异性强。**在基因编辑时需要两条gRNA靶向定位(相距范围一般在0-20bp), 双链切割后产生5'末端, 易于进行同源重组, 极大地降低了脱靶效应, 使得基因编辑的特异性增强, 避免后续实验中由于非特异性编辑产生的负面影响。
- **有核定位序列, 编辑效率高。**Cas9 Nickase (D10A) NLS在蛋白的N端和C端都含有SV40 T抗原的核定位序列(Nuclear localization signal or nuclear localization sequence, NLS), 使Cas9 Nickase与gRNA形成的复合物在转染进入细胞后能迅速地从细胞质进入到细胞核内, 从而大大地提高了基因编辑的效率。Cas9 Nickase可以通过显微注射、电穿孔和脂质体介导等方法进入细胞, 而这种不需要使用DNA的系统不会产生外源DNA整合至细胞基因组的风险[2]。
- 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[3,4]。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)相互作用的区域(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[3]。
- 碧云天生产的Cas9 Nickase (D10A) NLS体外酶活检测结果请参考图2。

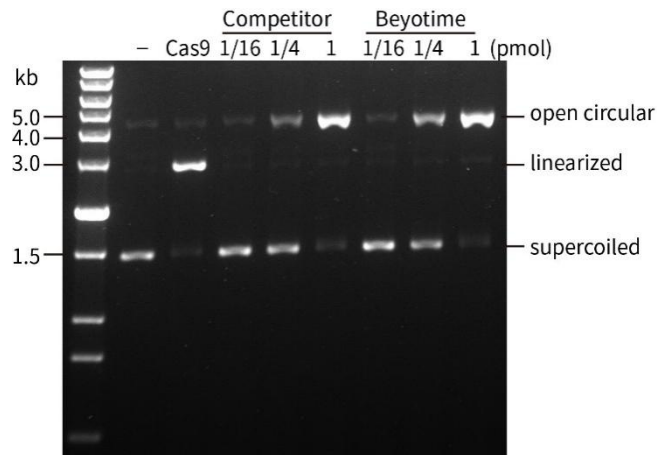


图2. 碧云天Cas9 Nickase (D10A) NLS (D0514)体外酶活检测的效果图。反应体系: 20 μ l水、3 μ l Cas9 Nickase Reaction Buffer (10X)、3 μ l 300nM gRNA (Target sequence: 5'-GGTTAATGTCATGATAATAA-3')、1 μ l Cas9 Nickase (D10A) NLS (分别为1/16、1/4、1pmol), 25 $^{\circ}$ C预孵育10分钟。然后加入3 μ l 30nM的pUCm-T (D2006)质粒, 37 $^{\circ}$ C孵育15分钟; 然后加入1 μ l蛋白酶K (ST533), 室温孵育10分钟以终止反应; 最后加入6 μ l DNA上样缓冲液(6X) (D0071), 进行电泳检测。gRNA与Cas9 Nickase结合后, 引导后者至pUCm-T与gRNA互补的序列互补的序列酶切产生缺刻, 致使质粒形成开环(Open circular), 而野生型的Cas9会使质粒发生线性化(Linearized)。如图2所示, 本产品与N公司(Competitor)的Cas9 Nickase (D10A) NLS具有相当的酶活性。实际检测效果会因样品种类、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、特异性gRNA; 与两种特定gRNA结合后利用电穿孔或者显微注射进行体内的基因编辑。
- **纯度:** SDS-PAGE电泳后纯度 \geq 95%, 不含DNA外切酶, 不含非gRNA依赖的DNA内切酶, 不含RNA酶, 不含磷脂酶。
- **浓度:** 1 μ M (160ng/ μ l); 20 μ M (3.2 μ g/ 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 Nickase 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
D0514S-1	Cas9 Nickase (D10A) NLS (1 μ M)	100 μ l
D0514S-2	Cas9 Nickase Reaction Buffer (10X)	0.5ml
-	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D0514M-1	Cas9 Nickase (D10A) NLS (20 μ M)	25 μ l
D0514M-2	Cas9 Nickase Reaction Buffer (10X)	2ml
-	说明书	1份

保存条件:

-20 $^{\circ}$ C保存, 至少一年有效。分装后在-80 $^{\circ}$ C可以保存更长时间, 须尽量避免反复冻融。

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. Cas9 Nickase (D10A) NLS体外消化DNA。

- a. 融解并混匀体外消化反应所需的各种溶液。将Cas9 Nickase (D10A) NLS、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。用无核酸酶水稀释适量Cas9 Nickase Reaction Buffer (10X)至Cas9 Nickase Reaction Buffer (1X)。Cas9 Nickase (D10A) NLS (20 μ M)推荐使用Cas9 Nickase Reaction Buffer (1X)稀释适量至Cas9 Nickase (D10A) NLS (1 μ M)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。无核酸酶水推荐使用BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile) (ST876)。

b. 按照下表配制反应体系。

Reagent	Volume
Water (DNase/RNase-Free)	20 μ l
Cas9 Nickase Reaction Buffer (10X)	3 μ l
gRNA (300nM)	3 μ l
Cas9 Nickase (D10A) NLS (1 μ M)	1 μ l
Total Volume	27 μ l

- c. 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，室温离心数秒，使液体积聚于管底。25°C预孵育10分钟。
- d. 加入3 μ l 30nM底物DNA (反应体系终体积为30 μ l)，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15分钟，反应时间可以根据实际情况适当延长至30-120分钟。
- e. 每个样品中加入1 μ l蛋白酶K (ST532)，轻轻混匀，室温孵育10分钟。
- f. 每个反应体系中加入6 μ l 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。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。

2. 也可以通过适当的蛋白转染试剂把Cas9 Nickase-gRNA转染至细胞内，具体请参考相应的蛋白转染试剂的产品说明书。

常见问题：

1. 为什么观察到目的DNA切割不完全？

- a. 可能是由于Cas9 Nuclease、gRNA、target DNA的比例不合适引起的，推荐Cas9 Nickase、gRNA、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。
- b. 可能与gRNA的序列有关，可以根据target DNA选择更合适的gRNA序列，不同的gRNA的效果会差别比较大。
- c. 可能由于gRNA降解引起的，可以通过凝胶电泳验证gRNA的完整性。
- d. 反应缓冲液可能不合适，请使用Cas9 Nickase自带的缓冲液Cas9 Nickase Reaction Buffer (10X)。

2. 为什么不同的gRNA之间的消化效率存在差异？

- a. gRNA的序列设计可能会影响消化效率，所设计的gRNA需要进行序列与模板的验证。
- b. gRNA的质量也可能会影响消化效率，利用琼脂糖凝胶电泳验证gRNA的完整性。

3. 如何优化用于基因编辑的gRNA对？

- a. 相比于3'突出(Overhang)的末端，产生5'突出的末端可以提高基因编辑的效率。利用Cas9 Nickase进行基因编辑的报道表明，当gRNA对以尾对尾(即5' - 5')的方向定向，在切割后可以产生5'突出的末端。
- b. 控制gRNA对间隔的距离。当gRNA对的间隔在10-30bp时可以进行有效的基因编辑。重叠的gRNA对和相隔较远的gRNA对(\geq 40bp)也可以检测到编辑，但效率较低。建议尝试多种gRNA对，以获得最佳的编辑效率。

4. 如何将酶稀释至1 μ M用于体外消化反应？

- a. 如需使用较高浓度的酶体外酶切DNA，可将酶在Cas9 Nickase Reaction Buffer (1X)中稀释至1 μ M后立即使用。稀释后不能冷冻保存。
- b. 如果1 μ M稀释液需要在-20°C保存，则应在反应组装前使用酶稀释溶液：10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 500 μ g/ml BSA, 50% (v/v) Glycerol (pH7.4@25°C)进行稀释。

参考文献：

1. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, et al. Cell. 2013. 154(6):1380-9.
2. Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, Kim JS. Genome Res. 2014. 24(6):1012-9.
3. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, et al. Cell. 2014. 156(5):935-49.
4. 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
D0510S	FnCas12a (Cpf1)	100pmol
D0510M	FnCas12a (Cpf1)	500pmol
D0510L	FnCas12a (Cpf1)	2000pmol
D0511S	Cas9 Nuclease (SpCas9)	50pmol
D0511M	Cas9 Nuclease (SpCas9)	250pmol
D0511L	Cas9 Nuclease (SpCas9)	1000pmol
D0513S	Cas9 NLS (SpCas9-NLS)	500pmol
D0513M	Cas9 NLS (SpCas9-NLS)	2500pmol
D0514S	Cas9 Nickase (D10A) NLS	100pmol
D0514M	Cas9 Nickase (D10A) NLS	500pmol
D0515S	Cas9 Nickase (H840A) NLS	100pmol
D0515M	Cas9 Nickase (H840A) NLS	500pmol
D0516S	dCas9 NLS	100pmol
D0516M	dCas9 NLS	500pmol
D0517S	LwaCas13a	700pmol
D0517M	LwaCas13a	3500pmol

Version 2023.12.09