

AsCas12a (cpf1) 核酸酶

AsCas12a (cpf1) Nuclease

Code No.AG51106

包装量:	500 μ l (1 μ M)
保存温度:	-20°C

> 产品概述

AsCas12a (cpf1) Nuclease 是一种来源于 *Acidaminococcus sp.* 的核酸内切酶。本产品是将 AsCas12a Nuclease 基因序列构建至质粒，并于大肠杆菌中重组表达和纯化获得的重组蛋白。

AsCas12a 酶在 crRNA 的引导下，可在靶标双链 DNA 存在 PAM (TTTV, V=A/C/G) 序列的情况下，对靶标双链 DNA 进行特异性剪切并形成粘性末端。此外，本产品具有反式剪切活性，即当 AsCas12a 酶与 crRNA、靶标双链 DNA 结合形成三元复合物后，便会被激活针对非特异 ssDNA 序列的反式剪切活性，将体系中的任意 ssDNA 序列切碎。

> 产品组成

AsCas12a (cpf1) Nuclease (1 μ M)	500 μ l
10X AsCas12a Nuclease Reaction Buffer	5 ml

> 保存及运输

保存温度: -20°C 保存

运输温度: 干冰运输或-20°C冰袋运输

> 注意事项

- AsCas12a (cpf1) Nuclease 使用前短暂离心将所有的溶液收集至离心管底部，并用移液器轻柔吸打混匀（避免起泡），切勿剧烈振荡，避免失活。
- AsCas12a (cpf1) Nuclease 对温度敏感，酶的添加及反应混合液的配制确保在冰上进行，使用完毕后建议立即置于 -20°C 保存。
- 10X AsCas12a Nuclease Reaction Buffer 使用前可短暂离心将溶液收集至离心管底部，避免损失。
- 产品使用时需添加 crRNA，涉及 RNA 操作，需要严格按照 RNA 操作的规范进行，避免实验过程中 RNase 污染，相关试剂和耗材需要确保 RNase free。

> 应用

- 在 crRNA 引导下剪切特定的 DNA 序列。
- 线性化含特定序列的环状双链 DNA。
- 与 RPA 技术结合用于核酸检测。

> 实验操作

顺式剪切反应

- 按照下表内容配制好反应液

组分名称	加入量 ^{*1}
10X AsCas12a Nuclease Reaction Buffer	1 X
AsCas12a (cpf1) Nuclease (1 μ M)	30 nM
crRNA	30 nM
Target DNA ^{*2}	3 nM
RNase free water	Up to 30 μ l

- 在 37°C 下反应 1 h 进行顺式剪切反应。
- 在 85°C 下，经过 10 分钟处理使 Cas12a 酶失活。
- 反应产物在 1% TAE 的琼脂糖凝胶中电泳用于结果分析。

*1: 本说明书涉及组分加入量均为体系中的终浓度。

*2: 用于剪切的 Target DNA 可以是双链 DNA 片段或环状双链 DNA，推荐用量为 50 nM~200 nM，不同长度的 Target DNA 所需酶量和 crRNA 的量需根据 Target DNA 的摩尔量计算，建议 Cas12a 酶 : crRNA : target DNA 的摩尔比为 10 : 10 : 1。

反式剪切反应¹

- 按照下表内容配制好反应液

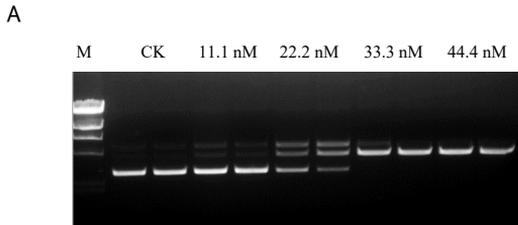
组分名称	加入量
10X AsCas12a Nuclease Reaction Buffer	1 X
AsCas12a (cpf1) Nuclease(1 μ M)	25 nM~250 nM
crRNA	25 nM~250 nM
Target DNA	2.5 nM~25 nM
ssDNA Reporter	25 nM~250 nM
RNase free water	Up to 20 μ l

- 使用实时荧光定量 PCR 仪检测荧光信号，37°C 反应 1 h，每 1 min 采集一次荧光信号。

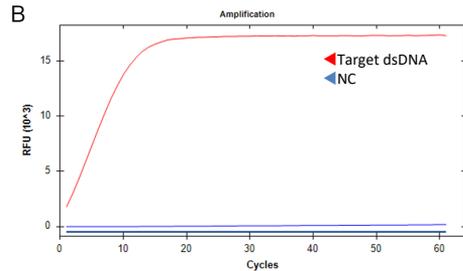
*1: 反式剪切体系各组分用量根据不同实验目的进行调整。

结果示例

顺式剪切效果图



反式剪切效果图



A: 1% TAE 凝胶电泳分析本产品对质粒 Supercoiled pBR322 DNA 的顺式剪切效果。

M 为 λ -Hind III digest, CK 为不含 AsCas12a 酶的对照组, 11.1 nM~44.4 nM 为含有不同浓度 AsCas12a 酶的实验组。

结果表明: CK 组不含 AsCas12a 酶, 无法形成 AsCas12a-crRNA 复合物, 因此不会切割靶标 pBR322。而实验组中, 在 crRNA 的引导下, 随着酶浓度的增加, 体系中 AsCas12a-crRNA 复合体的比例也随之提高, 切割靶标 pBR322 形成的线性化片段含量增加。当酶浓度达到 33.3 nM 时, 靶标 pBR322 完全线性化, 呈现出单一片段。

B: 实时荧光定量 PCR 仪检测 AsCas12a 酶的反式剪切效果。

NC 为未添加靶标 pBR322 DNA 的对照组, Target dsDNA 为添加靶标 pBR322 DNA 的实验组。Cas12a 酶与 crRNA、靶标 pBR322 形成三元复合物后, 在 crRNA 引导下, 将体系中带有荧光基团 (-FAM) 和淬灭基团 (-BHQ1) 的 ssDNA 切碎并发出荧光。

结果表明: NC 组未加入靶标 pBR322 DNA, 反式活性无法被激活, 体系中 ssDNA 探针无法被切割, 不产生荧光; 实验组加入靶标 pBR322 DNA 后, 反式活性被激活, 随反应时间增加, 体系中 ssDNA 探针被切割产生的荧光量增加, 当探针被完全切割后, 产生的荧光信号达到平台期。