

Cas9-NLS 核酸酶 (10 mg/ml)

Cas9-NLS Nuclease (10 mg/ml)

Code No. AG51110

包装量:	200 μ g (10 mg/ml)
保存温度:	-20°C

> 产品概述

本产品是将来源于野生型化脓性链球菌 (*S.pyogenes*) Cas9 核酸内切酶的序列, 在 N 端添加了一段核定位信号 (NLS) 修饰, 并于大肠杆菌重组表达纯化获得的蛋白。本产品具有良好的体外剪切功能和体内基因编辑功能, 可在向导 RNA (sgRNA) 引导下, 识别 NGG 的 PAM 序列, 结合双链 DNA 对其进行特异性切割, 在距离目标 DNA 中 PAM 序列的上游约 3 个碱基处产生双链断裂。此外, 本产品还具有 crRNA 和 tracrRNA 依赖性, 靶标 DNA 激活的反式 ssDNA 切割活性。

> 产品组成

组分名称	体积
Cas9-NLS Nuclease (10 mg/ml)	20 μ l
10X Cas9 Reaction Buffer	1 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

> 应用

1. 基于 CRISPR/Cas9 技术的基因编辑和基因修饰。
2. 基于反式活性的高灵敏度、高特异性核酸检测。
3. 体外筛选高效的 sgRNA 序列。
4. 在 sgRNA 引导下剪切特定的 DNA 序列。
5. 线性化含特定序列的环状双链 DNA。

> 注意事项

1. Cas9-NLS Nuclease 使用前短暂离心将所有的溶液收集至离心管底部, 减少损失, 并用移液器轻柔吸打混匀 (避免起泡), 切勿剧烈振荡, 避免其失活; 使用时建议存放于冰盒内, 使用完毕后建议立即置于 -20°C 保存。
2. 本产品 Cas9-NLS Nuclease 储存液含有 50% 的甘油, 可将蛋白稀释后进行体内实验, 以避免甘油对实验结果的影响。
3. 10X Cas9 Reaction Buffer 使用前请于冰上充分融化, 短暂离心, 将所有的溶液收集至离心管底部, 减少损失, 并用移液器轻柔吸打混匀 (避免起泡), 然后再进行使用。
4. 本产品使用时需添加 sgRNA, 操作时需注意防止实验环境和操作过程中的 RNase 污染。
5. 本产品未对体内实验体系进行推荐, 实验者可根据文献或相关的转染试剂盒说明书操作。
6. 10 mg/ml Cas9-NLS Nuclease 约等于 62305 nM Cas9-NLS Nuclease 。

➤ 实验操作

体外体系：

1. 按照下表内容配制好反应液

组分名称	加入量
Cas9-NLS Nuclease (10 mg/ml) ^{*1}	0.5 μg
10X Cas9 Reaction Buffer	3 μl
sgRNA (10 ng/μl) ^{**1}	10 μl
RNase free water	Up to 25 μl

2. 37°C 预孵育 5 min。
3. 加入 5 μl 底物靶 DNA(25 ng/μl)^{*1}，37°C 反应 60 min^{*2}。
4. 反应完成后，加入 1 μl 蛋白酶 K (20 mg/ml)，室温孵育 10 min。
5. 反应结束后，取适量反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。若不立即进行电泳，可置于-20°C 保存备用。

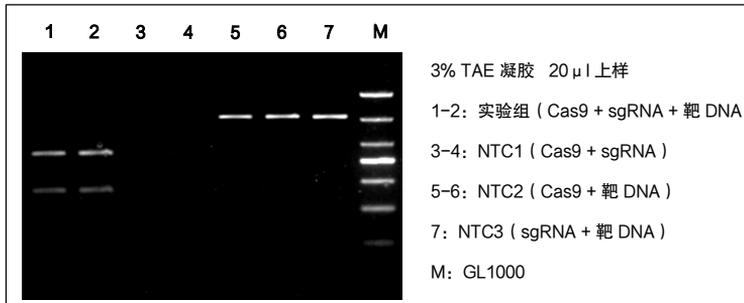
*1: 推荐实验中 Cas9-NLS Nuclease : sgRNA : 靶 DNA 的摩尔比为 10 : 10 : 1 或更高。

*2: 反应时间通常设定为 60 min，可根据实际情况适当延长至 60-120 min。

➤ 实验效果图

体外体系

本产品具有特异性双链剪切 DNA 的性能，靶 DNA 全长约 700bp，在设计 sgRNA 引导下，本产品可对靶 DNA 进行双链剪切，从而在凝胶上约 200bp 和 500bp 的位置形成两条带。（注：若要发生双链剪切，Cas9、sgRNA 和靶 DNA 三者缺一不可。）



体内体系

将 0.5 μg 本产品和靶向 EGFP 位点的 sgRNA，使用 Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Cas9 转染试剂 (Invitrogen™) 转染至 1.6×10^5 个表达 EGFP 的细胞内 (12 孔板体系)。荧光显微镜结果中，实验组较空白对照组的绿色荧光会明显降低 (如图 A 所示)，在流式细胞仪 15000 个细胞通量的计数下，实验组较空白对照组下降了 74.37% 的荧光细胞量 (如图 B 所示)。实验结果均表明，Cas9-NLS Nuclease 在 sgRNA 的引导下，对 EGFP 位点产生了有效的基因编辑。

