

Cas9 NLS (SpCas9-NLS)

产品编号	产品名称	包装
D0513S	Cas9 NLS (SpCas9-NLS)	500pmol
D0513M	Cas9 NLS (SpCas9-NLS)	2500pmol

产品简介:

- Cas9 NLS (SpCas9-NLS), 即含有核定位信号的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。本产品可以用于细胞内的CRISPR/Cas9系统介导的基因编辑, 也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。
- Cas9 NLS在Cas9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 NLS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 [1]。
- 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[2, 3]。同时通过构建设没有内切酶活性的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)[2]。

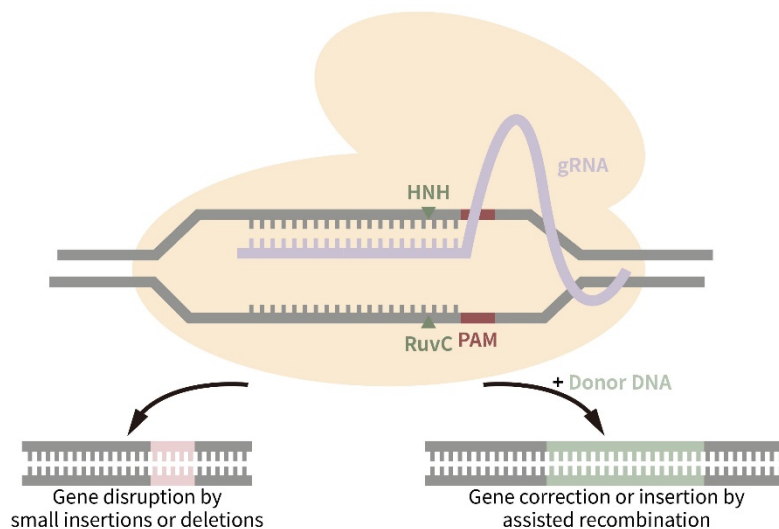


图1. 碧云天Cas9 NLS基因编辑示意图。

- 碧云天生产的Cas9 NLS体外酶活检测结果请参考图2。

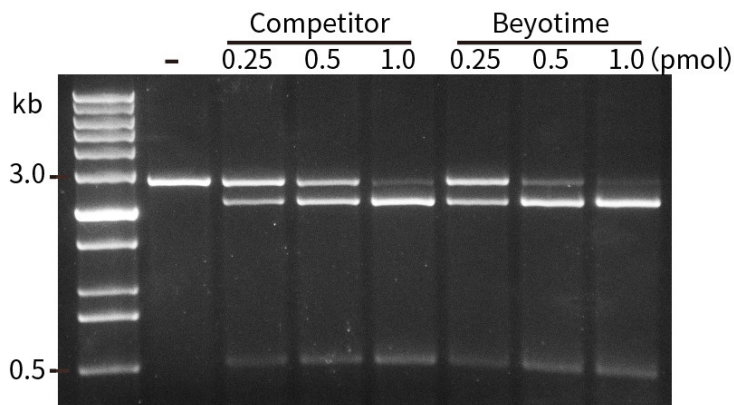


图2.碧云天生产的Cas9 NLS (D0513)体外酶活检测的效果图。反应体系: 20 μ l水、3 μ l Cas9 NLS Reaction Buffer(10X)、3 μ l 300nM gRNA(Target sequence: 5'-GGTTAATGTCATGATAATAA-3')、1 μ l Cas9 NLS (分别为0.25、0.5、1.0pmol), 25 $^{\circ}$ C预孵育10min。然后加入3 μ l 30nM的pUCm-T(D2006)线性化质粒, 37 $^{\circ}$ C孵育15min; 然后加入1 μ l蛋白酶K(Proteinase K, ST533), 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 NLS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 NLS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:** 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。
- **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:** 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 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
D0513S-1	Cas9 NLS (20 μ M)	25 μ l
D0513S-2	Cas9 NLS Reaction Buffer (10X)	2ml
-	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D0513M-1	Cas9 NLS (20 μ M)	125 μ l
D0513M-2	Cas9 NLS Reaction Buffer (10X)	10ml
-	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, 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应该是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-gRNA复合物电转细胞(以Neon[®] 电转系统为例)。

- a. 所需实验材料:
 - (a) HEK293细胞系, 若使用其他细胞如下实验方法可能需要进行适当优化
 - (b) Cas9 NLS
 - (c) 特异性靶向目的基因的gRNA
 - (d) Neon Transfection System 10 μ l kit (Thermo)
 - (e) PBS (C0221A)

- (f) 胰酶细胞消化液(C0201)
 - (g) 含有10%FBS以及Glutamax的DMEM
 - (h) 24孔细胞培养板(FCP243), 或者实验需要使用到的其它规格的培养板
 - (i) 基因组编辑突变检测试剂盒(D0508)
- b. 电转实验步骤:

- (a) 在电转前一天(18-24h)接种细胞(具体的细胞数量据细胞类型、大小和细胞生长速度等而定), 使第二天细胞密度达到约70-90%。
- (b) 以24孔板为例, 参考下表设置Cas9-gRNA形成反应。Resuspension Buffer R包括在Neon transfection kit中, 在此步骤中, 使用Resuspension Buffer R, 而无需使用 Cas9 NLS附带的Reaction Buffer (10X)。

Reagent	Volume
Resuspension Buffer R	10 μ l
Cas9 NLS (20 μ M)	2.5 μ l
gRNA (50 μ M)	2 μ l
Total Volume	14.5 μ l

- (c) 轻轻混匀上述反应体系, 并在室温下孵育20分钟。
- (d) 在孵育过程中, 用胰酶消化细胞, 将细胞重悬于5-10ml完全培养液中, 然后洗涤一次以除去胰蛋白酶残留。细胞计数确定活细胞数量。
- (e) 计算整个实验所需的细胞数量, 每次转染需要1-2 \times 10⁵细胞, 将细胞加入到无菌的离心管中。在500 \times g离心5min。用PBS洗涤细胞一次。
- (f) 根据细胞数量计算Resuspension Buffer R的体积, 每次转染需要10.5 μ l Resuspension Buffer R。用相应体积的Resuspension Buffer R重悬细胞。
- (g) 24孔板中每孔加入500 μ l完全培养基。
- (h) 每14.5 μ l的Cas9-gRNA体系中轻柔加入10.5 μ l细胞悬液并混匀。
- (i) 将10 μ l Cas9-gRNA与细胞混合物添加到10 μ l的Neon移液器吸头腔内。按照以下条件进行细胞电转: 1700V, 20ms, 1pulse。(以上条件仅供参考, 具体操作步骤及条件请参考您使用的电转试剂盒说明书进行)
- (j) 立即将细胞转移到含有培养基的24孔板中。
- (k) 将细胞在培养箱中孵育48-72h。
- (l) 使用基因组编辑突变检测试剂盒对电转后的细胞进行检测, 具体步骤参照产品说明书。

2. Cas9 NLS体外消化DNA。

- a. 溶解并混匀体外消化反应所需的各种溶液。将Cas9 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 NLS Reaction Buffer (10X)至Cas9 NLS Reaction Buffer (1X)。Cas9 NLS (20 μ M)推荐使用Cas9 NLS Reaction Buffer (1X)稀释适量备用, 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。推荐使用BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile) (ST876)。
- b. 按照下表配制反应体系(以30 μ l体系为例):

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

- c. 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 $^{\circ}$ C预孵育10min。
- d. 加入3 μ l 30nM底物DNA (30 μ l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 $^{\circ}$ 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。
- e. 每个样品中加入1 μ l蛋白酶K (ST532), 轻轻混匀, 室温孵育10min。
- 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 $^{\circ}$ 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。

3. Cas9 NLS也可以通过适当的蛋白转染试剂把Cas9-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 Nuclease、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 NLS自带的缓冲液Cas9 NLS Reaction Buffer (10X)。

2. 为什么不同的gRNA之间的消化效率存在差异?

- 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。
- 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。

参考文献:

- Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, Kim JS. Genome Res. 2014. 24(6):1012-9.
- 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)	100pmol
D0511S	Cas9 Nuclease (SpCas9)	50pmol
D0511M	Cas9 Nuclease (SpCas9)	250pmol
D0511L	Cas9 Nuclease (SpCas9)	1000pmol

Version 2022.10.05