



Cas9 NLS (SpCas9-NLS)

C744421

本公司生产的 Cas9 NLS (SpCas9-NLS), 即含有核定位信号的 CRISPR-associated endonuclease Cas9(也称 Csn1), 是本公司自主研发的技术平台表达、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。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/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。

来源 (Source)	大肠杆菌重组表达
外观 (Appearance)	无菌液体
保存液 (Storage Buffer)	10mM Tris, 300mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 50% (v/v) Glycerol, pH7.4 @25°C。
酶浓度 (Enzyme Concentration)	20 μ M (~3.2 μ g/ μ l)
纯度 (Purity)	不含 DNA 外切酶, 不含非 gRNA 依赖的 DNA 内切酶, 不含 RNA 酶。

组分和说明

Component	500pmol	5*500pmol	Storage
Cas9 NLS (20 μ M)	25 μ l	5*25 μ l	-20°C. Avoid freeze/thaw cycle.
Cas9 NLS Reaction Buffer (10X)	2ml	5*2ml	-20°C. Avoid freeze/thaw cycle.

产品应用

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。

产品优势

CRISPR/Cas9 是一项突破性的基因组编辑技术，操作便捷，应用广泛。

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

(f)胰酶细胞消化液

(g)含有 10%FBS 以及 Glutamax 的 DMEM

(h)24 孔细胞培养板，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

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 $1-2 \times 10^5$ 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。

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，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)，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？
- 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。

保存条件：

-20℃ 保存，≤0℃ 运输

注意事项：

- (1)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。
- (2)对于操作环境中核酸酶的去除，可以使用 RNase and DNase Away 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。
- (3)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。
- (4)为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。