

产品简介

Cas9 Nuclease是一个RNA导向的序列特异性双链DNA内切酶。向导RNA通过与靶序列互补来识别靶位点，并将Cas9 Nuclease带到靶DNA上。Cas9 Nuclease有两个切割活性中心，分别切割靶DNA的两条链从而产生DNA双链断裂。切割位点为靶向区域内和NGG/PAM相距三个碱基处。本产品是克隆Streptococcus pyogenes的Cas9基因后在大肠杆菌中表达纯化的高纯度Cas9活性蛋白。

产品组成

组 分	EN301-01 (50 pmol)	EN301-02 (250 pmol)
Cas9 Nuclease	50 μ l	250 μ l
Cas9 Nuclease Reaction Buffer (10 \times)	1 ml	1 ml

储存条件

-20 $^{\circ}$ C保存。

反应条件

1 \times Cas9 Nuclease Reaction Buffer, 37 $^{\circ}$ C孵育。

单位定义

1单位指30 $^{\circ}$ C条件下反应10分钟，能将0.5 pmol的dNTP掺入酸不溶性沉淀物所需要的酶量。

质量控制

蛋白纯度检测：通过SDS-PAGE考马斯亮蓝染色，Cas9 Nuclease蛋白纯度大于95%。

RNA酶残留检测：在10 μ l Cas9 Nuclease反应体系中加入40 ng RNA和1 pmol Cas9 Nuclease，37 $^{\circ}$ C孵育4个小时，通过琼脂糖凝胶电泳检测，大于90%的RNA保持完整。

内切酶活性检测：在50 μ l Cas9 Nuclease反应体系中加入0.6 μ g Supercoiled pBR322 DNA和1 pmol Cas9 Nuclease，37 $^{\circ}$ C孵育4个小时，电泳条带不发生变化。

外切酶活性检测：在50 μ l Cas9 Nuclease反应体系中加入1 μ g λ Hind III和1 pmol Cas9 Nuclease，37 $^{\circ}$ C孵育4个小时，电泳条带不发生变化。

用途

体外DNA切割

基因组改造

使用Cas9 Nuclease体外切割DNA操作方案:

为了保证最高的切割效率，Cas9 Nuclease和sgRNA与target DNA的摩尔比例至少为10:10:1或者更高。一般使用30 μ l体系，但也可以等比例放大。实验前请用无核酸酶的水将sgRNA稀释到300 nM，同时用无核酸酶的水将DNA稀释到30 nM。

1. 按下列顺序配制反应体系:

Nuclease-free water	20 μ l
10 \times Cas9 Nuclease Reaction Buffer(10 \times)	3 μ l
300 nM sgRNA	3 μ l
1 μ M Cas9 Nuclease	1 μ l
总体积	27 μ l

2. 37 $^{\circ}$ C孵育10分钟。

3. 加入3 μ l 30 nM的DNA

4. 震荡混匀并短暂离心收集。

5. 37 $^{\circ}$ C孵育1小时。

6. 反应产物可直接进行琼脂糖凝胶电泳分析。

注: 请佩戴口罩并使用无核酸酶的耗材与试剂, 避免操作过程中引入RNA酶。

结果图示:

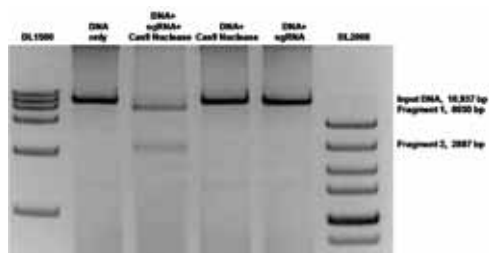


图1: 琼脂糖凝胶电泳分析11 kb双链DNA片段被Cas9 Nuclease体外切割后的结果