

Cat. No.: PC1400

Cas9 体外酶切试剂盒说明书

品名: Cas9 体外酶切试剂盒

货号: PC1400

产品简介: 本产品主要用于 CRISPR/Cas9 系统体外酶切实验、CRISPR 靶点筛选等实验。可以在体外切割 PCR 产物、质粒等双链 DNA。

试剂盒中提供了 Cas9 蛋白体外酶切所需试剂, 包括原核表达的 Cas9 蛋白(来自 *Streptococcus pyogenes*), 反应缓冲液, 以及对照 sgRNA 及其底物 DNA。使用该试剂盒可以快速开展 Cas9 体外酶切实验。

产品规格:

货号	PC1400-0	PC1400-1	PC1400-5
Cas9 蛋白	100U	100U	500U
10×Cas9 Buffer	150μl	150 μl	600 μl
阳性对照 sgRNA (0.1μg/μl)	-	25 μl	125 μl
阳性对照 DNA (0.2μg/μl)	-	25 μl	125 μl
RNase free H ₂ O	-	1 ml	5 ml
3M NaAc pH5.2	-	150 μl	600 μl

活性定义: 37°C, 30 分钟切割 1μg 1kB DNA 双链定义为 1 个活性单位。

储存条件: -20°C 冻存

使用方法:

使用前必读注意事项:

- 需要自备的试剂及耗材: 酚氯仿异戊醇试剂; 无水乙醇; 70%乙醇; 无 RNA 酶枪头、离心管。
- 务必使用无 RNA 酶的枪头、离心管配制 Cas9 反应体系。
- 推荐按照表中的顺序加入反应成分。加入 sgRNA 后吹吸数次混匀, 再加入其它反应成分。
- Cas9 蛋白会与 DNA 形成复合物, 影响电泳。反应液需要纯化后才能用于电泳。

实验步骤:

1、Cas9 切割反应:

按照下表配制 Cas9 体外切割反应缓冲液:

Cas9 蛋白	5 μl
sgRNA	0.5 μg
底物 DNA	1 μg
10×Cas9 Buffer	5 μl
RNase free H ₂ O	to 50 μl

阳性对照反应:

Cas9 蛋白	5 μl
阳性对照 sgRNA	5 μl
阳性对照 DNA	5 μl
10×Cas9 Buffer	5 μl
RNase free H ₂ O	to 50 μl

37°C 反应 30~60 分钟。

2、反应产物纯化:

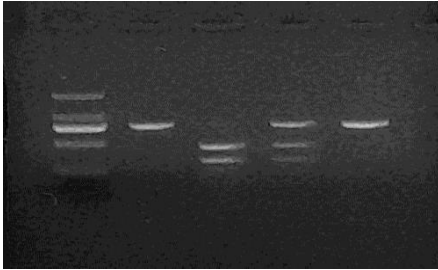
本步骤及以后的步骤不必使用无 RNA 酶耗材操作

- 在 50μl 反应产物中加入 5 μl 3M NaAc pH5.2, 混匀。
- 加入 50μl 酚氯仿异戊醇试剂。震荡混匀。
- 室温 12000rpm 离心 5min。
- 取上清至新的 1.5ml 离心管, 加入 100μl 无水乙醇, 混匀。
- 4°C 12000rpm 离心 10min。
- 去除上清, 加入 500μl 70%乙醇, 震荡混匀。
- 4°C 12000rpm 离心 5min。
- 去除上清, 空离 2min, 12000rpm, 用移液器尽量吸去残留液体, 开口室温放置 2-5min。
- 加入 10-15μl 蒸馏水, 震荡溶解沉淀。
- 取 3-5μl 进行凝胶电泳检测。

阳性对照:

阳性对照 DNA 为 760bp 双链 DNA。含有单一靶点。经过切割后形成 310bp 和 450bp 两条链。

M 1 2 3 4



阳性对照切割电泳图。

M: DL2000 DNA marker

- 4: Cas9 蛋白加 gRNA 切割 0min
- 3: Cas9 蛋白加 gRNA 切割 10min
- 2: Cas9 蛋白加 gRNA 切割 30min
- 1: Cas9 蛋白不加 gRNA 切割 30min

其它说明:

- 1、 体外转录的 sgRNA 大小为 100bp。在使用前无需去除转录模板 DNA。RNA 聚合酶及其他体外转录成分的存在对 Cas9 蛋白切割效果没有明显影响。但是为了准确定量 RNA，最好采用酚氯仿抽提乙醇沉淀纯化 RNA。
- 2、 在将 sgRNA 用于 Cas9 蛋白切割实验前，需要 sgRNA 的完整性。推荐用 2%琼脂糖凝胶电泳检测。RNA 条带应该为单一清晰的条带，无弥散。
- 3、 不是所有设计的 CRISPR 靶点都能被高效识别和切割，可以对同一段 DNA 靶序列设计 2-3 个靶点，同时进行体外切割实验。
- 4、 切割底物为双链 DNA，可以是质粒或者 PCR 产物。纯化方式可以为纯化柱或者乙醇沉淀。
- 5、 质粒切割时最好同时做阴性对照。

产品保存注意事项:

- 1、 Cas9 蛋白在需冰上融化后使用。注意使用过程中尽量保存在冰上。
- 2、 阳性对照 sgRNA 需用无 RNA 酶枪头取用，以免 RNase 污染导致降解。