

# PC1400



英茂盛业  
Inovogen Tech. Co.

## Cas9 体外酶切试剂盒说明书

\*更详细的说明书可以从我公司的微信公众号下载。

### 产品简介:

本产品主要用于 CRISPR/spCas9 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 体外酶切所需试剂,包括 spCas9 蛋白,反应缓冲液,以及对照 sgRNA 和底物 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-S0 (5 次)	PC1400-S1 (5 次)	PC1400-0 (20 次)	PC1400-1 (20 次)	PC1400-5 (100 次)
Cas9 蛋白	25U	25U	100U	100U	500U
10 × Cas9 Buffer	35μl	35μl	150μl	150 μl	600 μl
阳性对照 sgRNA	-	10μl	-	25μl	125μl
阳性对照 DNA	-	20 μl	-	50 μl	250μl
Cleaner 试剂	25 μl	25μl	100μl	100μl	500μl
3M NaAc pH5.2	-	50 μl	-	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

### 实验步骤:

#### 1、Cas9 切割反应:

1.1 需准备: 底物 DNA, 浓度大于 100ng/ul; sgRNA, 浓度大于 200ng/ul。

**! 务必采用无 RNA 酶的耗材进行实验, 注意防止 RNA 酶污染。**

按照下表配制 Cas9 体外切割反应缓冲液, 请按表中顺序加入:

Cas9 蛋白	5 μl
sgRNA	1μg (a μl)
底物 DNA	1~2μg (b μl)
10×Cas9 Buffer	Xμl*
<b>*X=0.1×(5+a+b)</b>	

#### 阳性对照反应:

Cas9 蛋白	5 μl
阳性对照 sgRNA	5μl
阳性对照 DNA	10μl
10×Cas9 Buffer	2 μl

#### 1.2 吹吸混合均匀。

##### 反应程序:

37°C 30min

85°C 10min

#### 2、产物检测:

##### 快速检测:

- 1) 在反应体系中加入 5μlCleaner, 混匀。55°C 孵育 5min。(本步骤及以后的步骤不必使用无 RNA 酶耗材操作)

2) 取 5 $\mu$ l 进行凝胶电泳检测(不必加入 DNALoadingBuffer)。

#### 乙醇沉淀法检测:

本方案耗时约 30min, 电泳条带更清晰。

本步骤及以后的步骤不必使用无 RNA 酶耗材操作

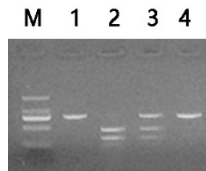
- 1) 加水将反应产物补足 50 $\mu$ l。
  - 2) 加入 50 $\mu$ l 酚氯仿异戊醇试剂。震荡混匀。
  - 3) 室温 12000rpm 离心 5min。
  - 4) 取上清至新的 1.5ml 离心管, 加入 5  $\mu$ l 3M NaAc pH5.2, 混匀。
  - 5) 加入 110 $\mu$ l 无水乙醇, 混匀。
  - 6) 4 $^{\circ}$ C 12000rpm 离心 10min。
  - 7) 去除上清, 加入 500 $\mu$ l 70%乙醇, 震荡混匀。
  - 8) 4 $^{\circ}$ C 12000rpm 离心 5min。
  - 9) 去除上清, 空离心 2min, 12000rpm, 用移液器尽量吸去残留液体, 开口室温放置 2-5min。
  - 10) 加入 10-15 $\mu$ l 蒸馏水, 震荡溶解沉淀。
- 取 3-5 $\mu$ l 进行凝胶电泳检测。

#### 2、阳性对照电泳结果:

阳性对照 DNA 为 760bp 双链 DNA。含有单一靶点。切割产物 310bp、450bp。

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



#### 产品保存和使用注意事项:

- 1、 Cas9 蛋白使用过程中尽量保持低温。
- 2、 阳性对照 sgRNA 需用无 RNA 酶枪头取用, 以免 RNase 污染导致降解。
- 3、 若切割效果不理想, 可提高 sgRNA 的含量。

#### 相关产品:

sgRNA 体外转录试剂盒货号: PC1380

spCas9 (spRY) 体外酶切试剂盒货号: PC1401

关注微信公众号下载电子版说明书:



 英茂盛业  
Inovogen Tech. Co.

023-67630383

order@inovogen.com

www.inovogen.com