

PC1400



英茂盛业
Inovogen Tech. Co.

spCas9 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 spCas9 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 spCas9 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)
spCas9 蛋白	25U	25U	100U	100U	500U
10 × spCas9 Buffer	35μl	35 μl	150μl	150 μl	600 μl
阳性对照 sgRNA	-	10 μl	-	25 μl	125 μl
阳性对照 DNA	-	20 μl	-	50 μl	250 μl
Cleaner 试剂	25 μl	25 μl	100 μl	100 μl	500 μl
3M NaAc	-	50 μl	-	150 μl	600 μl
pH5.2					

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、spCas9 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 spCas9 体外切割反应缓冲液,请按表中顺序加入:

spCas9 蛋白	5 μl
sgRNA	1 μg (a μl)
底物 DNA	1~2 μg (b μl)
10 × spCas9 Buffer	X μl*
*X=0.1×(5+a+b)	

阳性对照反应:

spCas9 蛋白	5 μl
阳性对照 sgRNA	5 μl
阳性对照 DNA	10 μl
10 × spCas9 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 5μl Cleaner, 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 5μl 进行凝胶电泳检测(不必加入 DNA Loading Buffer)。

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

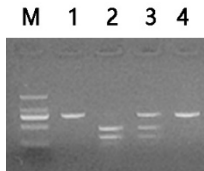
- 1) 加水将反应产物补足 50 μ l。
- 2) 加入 50 μ l 酚氯仿异戊醇试剂。震荡混匀。
- 3) 室温 12000rpm 离心 5min。
- 4) 取上清至新的 1.5ml 离心管，加入 5 μ l 3M NaAc pH5.2，混匀。
- 5) 加入 110 μ l 无水乙醇，混匀。
- 6) 4 $^{\circ}$ C 12000rpm 离心 10min。
- 7) 去除上清，加入 500 μ l 70%乙醇，震荡混匀。
- 8) 4 $^{\circ}$ C 12000rpm 离心 5min。
- 9) 去除上清，空离心 2min，12000rpm，用移液器尽量吸去残留液体，开口室温放置 2-5min。
- 10) 加入 10-15 μ l 蒸馏水，震荡溶解沉淀。
取 3-5 μ 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: spCas9 蛋白加 gRNA 切割 0min
- 3: spCas9 蛋白加 gRNA 切割 10min
- 2: spCas9 蛋白加 gRNA 切割 30min
- 1: spCas9 蛋白不加 gRNA 切割 30min



产品保存和使用注意事项：

- 1、 spCas9 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 突变体体外酶切试剂盒	货号：PC1401
LbCpf1 体外酶切试剂盒	货号：PC1500
saCas9 体外酶切试剂盒	货号：PC1600

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