

SpCas9-NLS

REF: EG24205-S/M

储运条件

-20°C

产品组成

组分	规格 S	规格 M
SpCas9-NLS (10 μM)	10 μl	100 μl
10× Cut Buffer C	1 ml	1 ml

产品简介

SpCas9-NLS 是一种 RNA 介导的核酸内切酶，来源于化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)。该酶可在 crRNA 和 tracrRNA (或两者连接形成的 sgRNA) 引导下，识别双链 DNA 靶标中 PAM 序列 (5'-NGG) 上游与 sgRNA spacer 序列互补的位置，并在 PAM 上游第 3 个碱基前端切割 DNA 双链。

SpCas9-NLS 常用于基因编辑，为提高细胞内编辑效率，本品 N 端带有猴病毒 40 (SV40) T 抗原核定位序列 (NLS)。本品亦可用于体外靶标 DNA 的剪切和基因克隆等。

失活条件

85°C 温浴 5 min。

质量控制

蛋白纯度

使用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测，蛋白纯度不低于 95%。

非特异性内切酶活性

将 10 pmol SpCas9-NLS 与 200 ng 超螺旋质粒 DNA 在 37°C 温育 4 h，使用琼脂糖凝胶电泳检测，少于 10% 的质粒 DNA 转变成缺刻或线性状态。

常见问题

问题描述	可能原因	解决办法
观察到目的 DNA 切割不完全	SpCas9 Nuclease、gRNA、target DNA 的比例不合适	推荐 SpCas9 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
	与 gRNA 的序列有关	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
	gRNA 降解	通过凝胶电泳验证 gRNA 的完整性
	反应缓冲液不合适	请使用 SpCas9-NLS 自带的缓冲液 10× Cut Buffer C
不同的 gRNA 之间的消化效率存在差异	gRNA 的序列设计	设计的 gRNA 需要进行序列与模板的验证
	gRNA 的质量	利用琼脂糖凝胶电泳验证 gRNA 的完整性

DNase 活性

将 10 pmol SpCas9-NLS 与 15 ng 双链 DNA 片段在 37°C 温育 16 h，使用琼脂糖凝胶电泳检测双链 DNA 底物无变化。

RNase 活性

将 10 pmol SpCas9-NLS 与 500 ng 总 RNA 在 37°C 温育 1 h，使用琼脂糖凝胶电泳检测超过 90% 的 RNA 仍保持完整。

使用方法

体外顺式切割实验

① 在冰上配制如下反应体系：

试剂	使用量	终浓度
10× Cut Buffer C	2 μl	1×
SpCas9-NLS (10 μM) ^a	0.5 μl	250 nM
sgRNA (10 μM) ^{a,b}	0.5 μl	250 nM
Target DNA (1 μM) ^a	0.5 μl	25 nM
Nuclease-free water	To 20 μl	

a. 如果用凝胶电泳检测切割产物，建议 Target DNA 用量为 100~500 ng，长度在 300 bp~3 kb 之间。建议 SpCas9-NLS : sgRNA : Target DNA 的摩尔比为 10:10:1，尽量确保靶标 DNA 被完全切割。

b. sgRNA 可参考以下序列设计：

5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAUGCUGAAAGCAUA
GCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCAC
CGAGUCGGUG-3' (下划线表示 Target DNA 特异性互补配对的 spacer 序列)。

② 37°C 反应 30 min~1 h 后，85°C 孵育 5 min 灭活；

③ 使用琼脂糖凝胶电泳检测产物。