

TAT-Cre Recombinase

产品编号	产品名称	包装
D0512-200μg	TAT-Cre Recombinase	200μg
D0512-1mg	TAT-Cre Recombinase	1mg
D0512-5mg	TAT-Cre Recombinase	5mg

产品简介:

- TAT-Cre Recombinase (TAT-Cre重组酶)是碧云天自主研发的PerfectProtein™技术平台表达、纯化获得的N-端含有组氨酸标签(His-tag)、细胞穿透肽TAT (Transactivator of transcription)以及细胞核定位信号肽(Nuclear localization signal, NLS)的Cre Recombinase重组蛋白。本产品常用于和培养细胞孵育, 实现细胞内 $loxP$ 位点间的DNA进行位点特异性重组。
- Cre Recombinase是来源于大肠杆菌噬菌体P1的一种I型拓扑异构酶(Type I topoisomerase), 也是一种酪氨酸重组酶(Tyrosine recombinase), 能识别34bp的 $loxP$ 位点, 两端为两个13bp的反向重复序列(Inverted repeats, ATAACCTTCGTATA and TATACGAAGTTAT), 中间是8bp的间隔区(Spacer region, NNNTANNN), 并能催化 $loxP$ 位点之间的DNA发生重组。重组产物根据 $loxP$ 位点的位置和相对方向的不同而不同, 两个含单 $loxP$ 位点的DNA将发生融合: 两个同方向的 $loxP$ 位点间的DNA将以环状形式被切割, 而两个反向 $loxP$ 位点间的DNA序列将被翻转(图1) [1,2]。

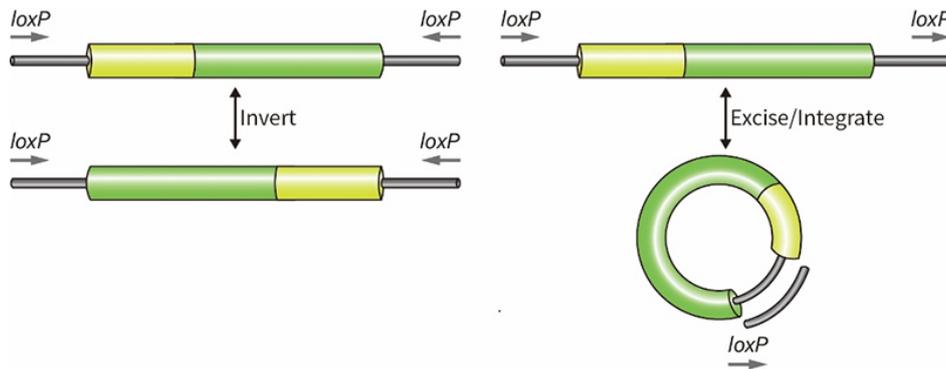


图1. Cre- $loxP$ 位点特异性重组示意图。

- 细胞穿透肽TAT是来源于自HIV-1病毒复制和基因表达所必须的反式激活因子中的一段约10个氨基酸的带有正电荷的肽段。目前有研究表明, TAT融合蛋白可以通过Caveolar介导的胞吞作用(Caveolar endocytosis)被细胞内化, 不依赖于网格蛋白介导的胞吞作用。因而可以使得与之融合后的各种分子(包括多肽、蛋白质、反义寡核苷酸链、磁性纳米颗粒和脂质体)能够穿透细胞膜, 可以适用于很多方面的应用 [3]。
- Cre Recombinase在体外和体内DNA的遗传改造中具有广泛的应用价值, 但其局限性之一在于难以在哺乳动物细胞中表达传递具有稳定活性的酶。针对这一问题的常用操作有: 瞬时转染表达Cre Recombinase的DNA载体, 但存在转染效率低, 导致重组效率不稳定或低的问题; 病毒转导, 该方法虽然更有效, 但存在插入突变的风险。碧云天研发的细胞渗透性TAT-Cre Recombinase的重组融合蛋白可以直接传递至哺乳动物细胞内, 由NLS辅助融合蛋白迅速入核, 催化高效重组, 同时对使用剂量以及作用时间均能够进行精准地控制, 避免了外源的DNA整合至基因组中, 对实验结果产生影响。
- 碧云天生产的TAT-Cre Recombinase体内催化位点特异性重组的效果请参见图2。

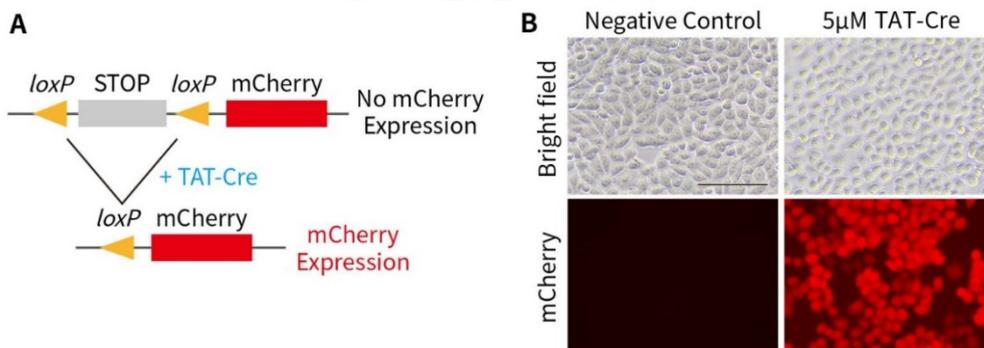


图2. 碧云天TAT-Cre Recombinase (D0512)介导两个同向 $loxP$ 位点之间序列切除的效果图。图A为实验原理。在没有TAT-Cre Recombinase存在的情况下, mCherry的表达会被阻断, 观察不到红色荧光; TAT-Cre Recombinase存在的情况下, 可以对

*IoxP*位点进行重组，去除两个*IoxP*位点之间的STOP元件，从而激活mCherry的表达。图B为实验结果。在转染前一天按照每孔约10万*IoxP*-STOP-*IoxP*-mCherry HeLa Cells (C8012)接种到24孔板内进行培养，使第二天细胞密度能达到约60%。取两个洁净无菌离心管，用完全培养基将TAT-Cre Recombinase稀释至10 μ M，并用移液器充分吹打混匀，经0.2 μ m的滤器过滤后，转移至另一离心管中，再次充分混匀备用。在转染之前，将培养有细胞的24孔板每孔用500 μ l PBS洗一遍，然后分别将5 μ M的TAT-Cre Recombinase均匀滴加到整个孔内，500 μ l/孔，随后轻轻混匀。转染24h后，通过荧光显微镜观察到红色荧光。图中比例尺为100 μ m。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。2.5nmol/孔，100uM 50ul = 5nmol，Merk 推荐的工作浓度200ug/ml，相当于20倍稀释使用，50ul仅够2个孔。6孔，1.2ml，12孔0.6ml，24孔0.3ml

- **来源：**TAT-Cre Recombinase通过大肠杆菌(*E.coli*)重组、表达、纯化而获得。
- **用途：**体内催化*IoxP*位点间序列进行位点特异性重组。
- **浓度：**4mg/ml (约100 μ M)。
- **纯度：**经SDS-PAGE电泳检测，纯度大于95%。
- **酶储存溶液：**50mM NaH₂PO₄, 500mM NaCl, 5mM Tris, pH8.0, 10% (v/v) Glycerol。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D0512-200 μ g	TAT-Cre Recombinase (4mg/ml)	50 μ l
D0512-1mg	TAT-Cre Recombinase (4mg/ml)	250 μ l
D0512-5mg	TAT-Cre Recombinase (4mg/ml)	1.25ml
—	说明书	1份

保存条件：

-80 $^{\circ}$ C保存，一年有效。

注意事项：

- 高浓度的TAT-Cre Recombinase会对细胞产生毒性，建议进行预实验确定最佳使用浓度。但需要注意的是，产生细胞毒性是正常现象，少部分细胞能存活下来通常预示着会获得比较好的重组效果。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 在转染的前一天(18-24h)接种细胞(具体的细胞数量因细胞类型、大小和细胞生长速度而不同，可以进行预实验确定最佳接种数量)，使第二天细胞密度达到约60-80%。以*IoxP*-STOP-*IoxP*-mCherry HeLa Cells (C8012)为例，可以在前一天接种10⁵个细胞至24孔板内进行培养过夜。
2. 以24孔板为例，取适量解冻的TAT-Cre Recombinase用完全培养基稀释至适当浓度(推荐在1-10 μ M浓度范围内进行摸索和尝试，初次实验推荐尝试3、4、5、6和7 μ M)，并用移液器充分吹打混匀，经0.2 μ m孔径滤器过滤后备用。将培养有细胞的24孔板每孔用500 μ l PBS洗涤一次，然后把稀释好的TAT-Cre Recombinase均匀滴加到整个孔内，500 μ l/孔，并轻轻混匀。
注：如果希望节约使用TAT-Cre Recombinase，可以保持工作浓度不变，适当减小使用体积，使稀释好的TAT-Cre Recombinase能充分覆盖细胞即可。
3. 将细胞放入细胞培养箱内孵育。初次处理时建议每30-60分钟后观察细胞状态，当细胞出现明显的死亡时(死亡率达到50-80%)，须使用PBS洗涤两次以避免TAT-Cre Recombinase产生进一步的细胞毒性。由于不同类型的细胞对于TAT-Cre Recombinase的敏感性不同，建议进行预实验以确定最佳作用时间。
注：TAT-Cre Recombinase浓度较高时会对细胞会产生一定的毒性，细胞毒性可以被看作TAT-Cre Recombinase穿透细胞膜进入细胞的指标；通常较多细胞出现死亡，但仍然有部分细胞能存活时，是比较理想的情况，此时能获得重组效果比较理想的细胞。如果没有明显的细胞毒性，通常宜适当提高TAT-Cre Recombinase的浓度。
4. 加入新鲜的完全培养液进行培养，建议每天或者每隔一天更换培养液。
5. 后续酌情使用多克隆细胞或筛选单克隆细胞用于后续实验。无论多克隆细胞还是单克隆细胞，都可以提取基因组DNA并进行；常规PCR的定性鉴定或qPCR的定量鉴定。

常见问题：

1. **为什么TAT-Cre Recombinase处理后阳性率较低？**
 - a. 可能是由于保存不当导致酶活性下降。建议分装后于-80 $^{\circ}$ C保存，须避免反复冻融。
 - b. 不同的细胞对于TAT-Cre Recombinase的敏感度不同，建议进行预实验找到合适的工作浓度。
 - c. 可以尝试在TAT-Cre Recombinase处理时使用100mM氯喹来增强效果。

参考文献：

1. Pinkney JN, Zawadzki P, Mazuryk J, Arciszewska L K, Sherratt D J, et al. PNAS. 2012. 109(51):20871-6.
2. Kühn R, Torres RM. Methods Mol Biol. 2002. 180:175-204.
3. Wadia JS, Stan RV, Dowdy SF. Nat Med. 2004. 10(3):310-5.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D2608-1μg	pCMV-Cre-EGFP	1μg
D2608-100μg	pCMV-Cre-EGFP	100μg
D2607-1μg	pCMV-Cre-mCherry	1μg
D2607-100μg	pCMV-Cre-mCherry	100μg
D0508S	基因组编辑突变检测试剂盒	25次
D0508M	基因组编辑突变检测试剂盒	100次
D7080S	T7 Endonuclease I (CRISPR等基因突变鉴定用)	250U
D7080M	T7 Endonuclease I (CRISPR等基因突变鉴定用)	1250U
D7080L	T7 Endonuclease I (CRISPR等基因突变鉴定用)	5000U
D0509S	Cre Recombinase	50U
D0509M	Cre Recombinase	250U
D0509L	Cre Recombinase	1000U
C7996	LoxP-STOP-loxP-EGFP HeLa Cells	1支/瓶
C7998	LoxP-STOP-loxP-mCherry HeLa Cells	1支/瓶
C4102-100μl	Lenti-EF1α-Cre-P2A-EGFP-Puro (10 ⁸ TU/ml)	100μl
C4102-1ml	Lenti-EF1α-Cre-P2A-EGFP-Puro (10 ⁸ TU/ml)	1ml
C4105-100μl	Lenti-EF1α-Cre-P2A-mCherry-Puro (10 ⁸ TU/ml)	100μl
C4105-1ml	Lenti-EF1α-Cre-P2A-mCherry-Puro (10 ⁸ TU/ml)	1ml
D0510	FnCas12a (Cpf1)	70pmol
D0511S	Cas9 Nuclease (SpCas9)	50pmol
D0511M	Cas9 Nuclease (SpCas9)	250pmol
D0511L	Cas9 Nuclease (SpCas9)	1000pmol
D0513S	Cas9 NLS	500pmol
D0513L	Cas9 NLS	2500pmol
D7085	BeyoCRISPR™ Quick Construction Kit (mOrange2 Reporter)	10次
D7086	BeyoCRISPR™ Quick Construction Kit (CD4 Enrichment)	10次
D7087	BeyoCRISPR™ Quick Construction Kit (Puro)	10次

Version 2024.08.25