

dCas9 NLS

产品编号	产品名称	包装
D0516S	dCas9 NLS	100pmol
D0516M	dCas9 NLS	500pmol

产品简介:

- dCas9 NLS, 是碧云天自主研发的PerfectProtein™技术平台表达、纯化获得的一种含核定位信号(Nuclear localization signal or nuclear localization sequence, NLS), 能在gRNA引导下序列特异性地结合双链DNA而不能进行切割的核酸酶。
- dCas9 NLS是通过Cas9核酸酶的RuvC和HNH结构域内的氨基酸突变产生的D10A/H840A双突变体。与野生型的Cas9核酸酶一样, dCas9 NLS利用gRNA靶向目标DNA序列, 但是与切割双链的野生型不同, 由于RuvC和HNH结构域的突变, dCas9 NLS仅仅具有由gRNA引导的与DNA结合的活性而没有内切酶活性(图1)。研究发现, dCas9 NLS与不同功能的蛋白结合时, 可以有效抑制或促进基因的表达, 与此同时, dCas9 NLS也为这些蛋白结合到特定的基因组位点提供了一个平台[1]。

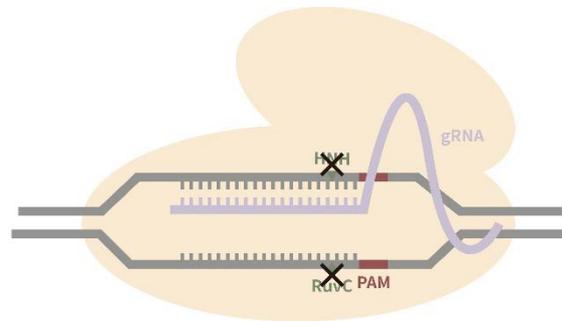


图1. 碧云天dCas9 NLS (D0516)作用示意图。

- dCas9 NLS在蛋白的N端和C端都含有SV40 T抗原的核定位序列(Nuclear localization signal or nuclear localization sequence, NLS), 使dCas9 NLS与gRNA形成的复合物在转染进入细胞后、能迅速地由细胞质进入到细胞核内。dCas9 NLS可以通过显微注射、电穿孔和脂质体介导等方法进入细胞, 而这种不需要使用DNA的系统不会产生外源DNA整合至细胞基因组的危险[2]。
- CRISPR/Cas9是一项突破性的基因组编辑技术, 操作便捷, 应用广泛。CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)是一种原核生物利用RNA引导的DNA核酸酶Cas9对外源的噬菌体或病毒核酸进行基因沉默的获得性免疫系统(Adaptive immune system), 后续在此基础上逐渐发展为广泛应用于原核和真核生物的越来越成熟的基因编辑技术。该技术能够在gRNA引导下通过Cas9对原核和真核生物的基因组DNA的靶向序列进行位点特异性的切割, 然后通过易错修复(Error-prone repair)或同源重组(Homologous recombination)在切割位点改变或插入序列来产生移码突变, 从而实现基因敲除。其中gRNA确保识别位点的特异性。随着CRISPR技术的发展, 该技术目前不仅可以实现基因敲除, 还可以实现基因的点突变、插入突变等多种突变方式, 特别是在临床应用方面可以用于修复不良突变等[3,4]。同时通过构建没有内切酶活性的Cas9突变体dCas9, 通过与dCas9直接融合表达或间接招募转录激活或转录抑制因子, 可以实现sgRNA靶向基因的转录激活或转录抑制。
- CRISPR/Cas9系统由Cas9 Nuclease和gRNA复合物所组成。gRNA, 也称sgRNA (Single guide RNA), 由18-20bp与靶基因序列互补的CRISPR RNA (crRNA)序列以及能与Cas9特异性结合的trans-activating crRNA (tracrRNA)序列组成。gRNA通过与靶序列之间的互补配对, 将Cas9 Nuclease引导至靶DNA, Cas9 Nuclease C端的与PAM (Proto-spacer adjacent motif)相互作用的结构域(PAM-interacting domain)识别富含G碱基(5'-NGG-3')的PAM序列, 在HNH和RuvC两个结构域的协同作用下, 在PAM序列NGG上游大约三个碱基处产生DNA的双链断裂(Double-strand break, DSB)。如果该双链DNA断裂发生在细胞内, 在细胞DNA修复过程中会导致基因靶位点处的插入、删除或替换, 从而可能产生移码突变, 导致目的基因的缺失突变 [3]。
- 碧云天生产的dCas9 NLS体外酶活检测效果请参考图2。

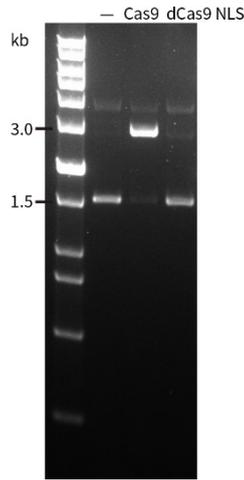


图2. 碧云天dCas9 NLS (D0516)体外酶活性检测的效果图。反应体系：20 μ l水、3 μ l Cas9 NLS Reaction Buffer (10X) (D0513)、3 μ l 300nM gRNA (Target sequence: 5'-GGTTAATGTCATGATAATAA-3')、1pmol dCas9 NLS, 25 $^{\circ}$ C预孵育10分钟。然后加入3 μ l 30nM的pUCm-T (D2006)质粒, 37 $^{\circ}$ C孵育15分钟; 然后加入1 μ l蛋白酶K (ST533), 室温孵育10分钟以终止反应; 最后加入6 μ l DNA上样缓冲液(6X) (D0071), 进行电泳检测。dCas9 Nuclease由于没有切割活性, 故而结果与阴性对照一致, 而野生型的Cas9会使质粒发生线性化。实际检测效果会因样品种类、检测条件等的不同而存在差异, 本图仅供参考。

- **来源:** 通过*E.coli*重组、表达、纯化而获得, 表达基因来源于*Streptococcus pyogenes*。
- **用途:** 基因的表达调控; 基因组位点成像; 基因富集等。
- **纯度:** SDS-PAGE电泳后纯度 \geq 95%, 不含DNA外切酶, 不含DNA内切酶, 不含RNA酶, 不含磷脂酶。
- **浓度:** 1 μ M (160ng/ μ l); 20 μ M (3.2 μ g/ μ l)。
- **酶储存溶液:** 10mM Tris, 300mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 50% (v/v) Glycerol, pH7.4@25 $^{\circ}$ C。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D0516S	dCas9 NLS (1 μ M)	100 μ l
D0516M	dCas9 NLS (20 μ M)	25 μ l
-	说明书	1份

保存条件:

-20 $^{\circ}$ C保存, 至少一年有效。分装后在-80 $^{\circ}$ C可以保存更长时间, 须尽量避免反复冻融。

注意事项:

- 本产品使用时会涉及gRNA和DNA的操作, 必须注意RNase-free和DNase-free的相关操作。所有自行准备的试剂和耗材也都应是Nuclease-free的。如果可能有核酸酶污染, 可考虑用0.01%的DEPC处理过夜, 然后高温高压处理后使用。操作时建议戴一次性口罩操作。
- 对于操作环境中核酸酶的去除, 推荐使用碧云天生产的RNase and DNase Away (R0123)以去除实验桌、仪器设备等表面或其它接触面上的核酸酶。反应体系中推荐加入RNase Inhibitor以保护RNA不被降解。
- 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. 可以通过适当的蛋白转染试剂把dCas9-gRNA转染至细胞内, 具体请参考相应的蛋白转染试剂的产品说明书。

常见问题:

1. **如何将酶稀释至1 μ M用于体外消化反应?**
 - a. 如需使用较高浓度的酶体外酶切DNA, 可将酶在Cas9 NLS Reaction Buffer (10X) (D0513)中稀释至1 μ M后立即使用。稀释后不应冷冻。
 - b. 如果1 μ M稀释液需在-20 $^{\circ}$ C保存, 则应在反应组装前使用酶稀释溶液: 10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 500 μ g/ml BSA, 50% (v/v) Glycerol (pH7.4@25 $^{\circ}$ C)进行稀释。

参考文献:

1. Brocken DJW, Tark-Dame M, Dame RT. Curr Issues Mol Biol. 2018. 26:15-32.
2. Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, Kim JS. Genome Res. 2014. 24(6):1012-9.
3. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, et al. Cell. 2014. 156(5):935-49.
4. Marangi M, Pistritto G. Front Pharmacol. 2018. 9:396.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
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
ST532	Proteinase K (20mg/ml)	0.2ml
R0123	RNase and DNase Away	250ml
R0102-2kU	RNase Inhibitor	2000U
R0102-10kU	RNase Inhibitor	10000U
R0102-50kU	RNase Inhibitor	50000U
D0509S	Cre Recombinase	50U
D0509M	Cre Recombinase	250U
D0509L	Cre Recombinase	1000U
ST876-100ml	BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)	100ml
ST876-500ml	BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)	500ml
D7062	SP6 RNA Polymerase	500U
D7066	T3 RNA Polymerase	500U
D7069	T7 RNA Polymerase	1000U
D7383	NTP set (100mM each, Nuclease free)	4×250µl
D0510S	FnCas12a (Cpf1)	100pmol
D0510M	FnCas12a (Cpf1)	500pmol
D0510L	FnCas12a (Cpf1)	2000pmol
D0511S	Cas9 Nuclease (SpCas9)	50pmol
D0511M	Cas9 Nuclease (SpCas9)	250pmol
D0511L	Cas9 Nuclease (SpCas9)	1000pmol
D0513S	Cas9 NLS (SpCas9-NLS)	500pmol
D0513M	Cas9 NLS (SpCas9-NLS)	2500pmol
D0514S	Cas9 Nickase (D10A) NLS	100pmol
D0514M	Cas9 Nickase (D10A) NLS	500pmol
D0515S	Cas9 Nickase (H840A) NLS	100pmol
D0515M	Cas9 Nickase (H840A) NLS	500pmol
D0516S	dCas9 NLS	100pmol
D0516M	dCas9 NLS	500pmol
D0517S	LwaCas13a	700pmol
D0517M	LwaCas13a	3500pmol

Version 2023.12.09