

LwaCas13a

产品编号	产品名称	包装
D0517S	LwaCas13a	700pmol
D0517M	LwaCas13a	3500pmol

产品简介:

- 碧云天生产的LwaCas13a, 也称C2c2, 是由碧云天自主研发的PerfectProtein™技术平台表达、纯化获得的一种由RNA引导并靶向RNA的重组核酸内切酶。
- CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)是一种原核生物利用RNA引导的核酸酶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CRISPR/Cas基因编辑技术。基于crRNA效应复合物中的Cas蛋白, CRISPR-Cas系统分为两类。第I类CRISPR-Cas系统利用多蛋白效应复合物发挥作用, 目前其可分为3种类型和12种亚型; 而第II类CRISPR-Cas系统只需用单一的Cas效应蛋白即可对外源核酸序列进行识别和切割, 目前其可分为3种类型和9种亚型。第II类CRISPR-Cas系统由于作用机制简单, 因此受到广泛关注, 其中CRISPR-Cas9系统属于第II类II型, CRISPR-Cas12a系统属于第II类V型[2], CRISPR-Cas13a系统属于第II类VI型。Cas9和Cas12在DNA基因编辑中已经得到非常广泛的应用; 最近发现Cas13在RNA调控中起重要作用, 目前Cas13已应用于转录组工程、病毒干扰、核酸检测和RNA成像等方面[1]。
- LwaCas13a来源于 *Leptotrichia wadei* 菌株, 分子量约为140kDa, 与其它II类CRISPR-Cas效应物不同, LwaCas13a缺乏DNA酶结构域, 但具有高等真核生物和原核生物中与核苷酸结合(Higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding, HEPN)的两个结构域, 这两个结构域参与RNA切割。除此之外, Cas13a识别的不是PAM (Protospacer adjacent motif)序列, 而是PFS (Protospacer flanking site)位点; LwaCas13a对于PFS位点均没有偏好(即A、U、G、C均可), 而来源于其它菌株的Cas13a则偏好于A、U、C [3]。
- LwaCas13a会通过两种方式展现其核糖核酸酶活性; 一种是通过特异性方式激活顺式剪切(cis-cleavage), LwaCas13a在crRNA引导下识别并切割靶标单链RNA (Single strand RNA, ssRNA); 另一种是通过非特异性方式激活反式剪切(trans-cleavage), 当LwaCas13a与crRNA、靶标ssRNA三者结合形成三元复合物后, 便会被激活针对非特异ssRNA的反式剪切活性, 即LwaCas13a蛋白不仅能够切割靶标ssRNA, 还能将反应体系中的任意序列单链RNA切碎, 参考图1。基于该原理, Broad研究所的张锋团队开发了名为SHERLOCK (Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking)的核酸快速检测工具[4]。

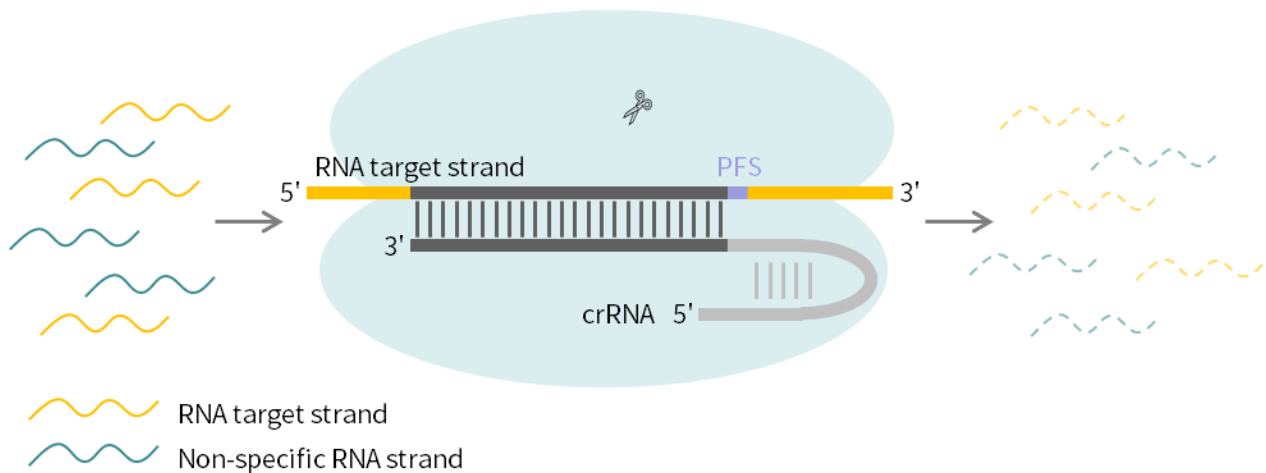


图1. 碧云天LwaCas13a核酸酶作用原理示意图。

- 碧云天LwaCas13a酶活性检测结果参考图2。

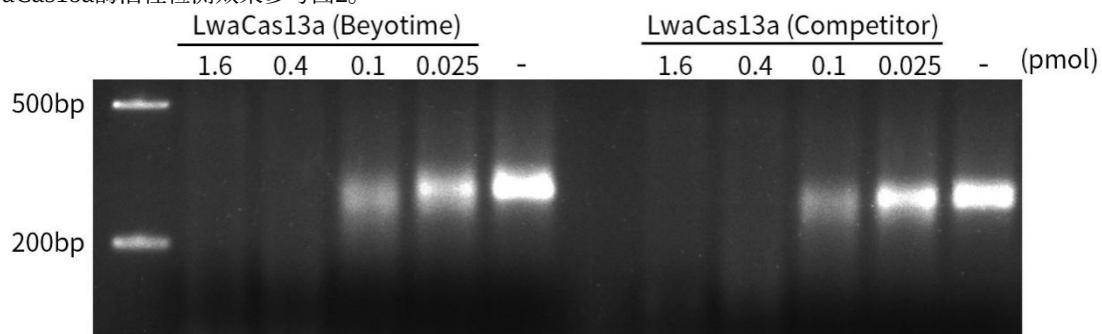


图2. 碧云天LwaCas13a (D0517)和G公司的LwaCas13a酶活性检测对比效果图。6.5μl Nuclease-free Water, 1μl 10X Reaction Buffer、1μl crRNA (0.75pmol)、1μl LwaCas13a (分别为1.6、0.4、0.1、0.025pmol)和0.5μl RNase Inhibitor (40U/μl), 在37°C预孵育10分钟; 然后在10μl的预孵育反应体系中加入8μl Nuclease-free Water、1μl 10X Reaction Buffer、1μl靶标ssRNA (2pmol)形成20μl反应体系, 在37°C孵育30分钟; 再加入1μl Proteinase K (20mg/ml) (ST533), 室温孵育10分钟以终止反应; 最后加入4μl DNA上样缓冲液(6X) (D0071), 进行2%的琼脂糖凝胶电泳检测。crRNA与LwaCas13a结合后, 引导后者至靶标ssRNA产生酶切, ssRNA被切割后降解。如图所示, 本产品与G公司的LwaCas13a具有相近的酶活性。实际检测效果会因样品、具体实验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, 表达基因来源为 *Leptotrichia wadei*。
- **用途:** 可用于体外RNA切割、体外RNA检测、活细胞RNA调控、RNA基因编辑、光学探针生物学标记等。
- **纯度:** 不含DNA内切酶和外切酶, 不含自身之外的RNA酶。
- **浓度:** 35μM (约5mg/ml)。
- **酶储存溶液:** 20 mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 1 mM DTT, 50% (v/v) Glycerol, pH8.0 @ 25°C。
- **10X Reaction Buffer:** 400mM Tris-HCl, 600mM NaCl, 60mM MgCl₂, pH7.3 @ 25°C。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D0517S-1	LwaCas13a (35μM)	20μl
D0517S-2	10X Reaction Buffer	1ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D0517M-1	LwaCas13a (35μM)	100μl
D0517M-2	10X Reaction Buffer	5ml
—	说明书	1份

保存条件:

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

注意事项:

- 本产品使用过程中需要确保Nuclease-free, 操作时应特别小心, 避免被污染。所有操作都需要按照RNase-free的要求进行。
- 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)以去除实验桌面上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. 靶标RNA切割实验。

- a. 融解并混匀靶标RNA切割反应所需的各种溶液。crRNA和靶标ssRNA可以通过公司直接合成; 也可将片段连接至体外转录质粒中, 推荐使用碧云天pRNA-T3-T7 (RNA体外转录质粒) (D2312)或pRNA-SP6-T7 (RNA体外转录质粒) (D2314), 线性化质粒后, 再通过RNA聚合酶合成所需ssRNA。将LwaCas13a、crRNA、靶标ssRNA置于冰上, 使用无核酸酶水稀释crRNA至400nM, 靶标ssRNA至60nM。用无核酸酶水稀释适量10X Reaction Buffer至1X Reaction Buffer。LwaCas13a (35μM)推荐使用1X Reaction Buffer稀释至LwaCas13a (1μM)备用, 稀释后宜尽快使用, 不能冻存后使用, 以避免反复冻融导致酶活性下降。无核酸酶水推荐使用BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile) (ST876)。

- b. 室温下按照下表中的顺序设置反应体系。

Reagent	Volume
Nuclease-free water	6.5μl
10X Reaction Buffer	1μl
crRNA (400nM)	1μl
LwaCas13a (1μM)	1μl
RNase Inhibitor (40U/μl)	0.5μl
Total volume	10μl

用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀, 室温离心数秒, 使液体积聚于管底, 37°C预孵育10分钟。

- c. 按照表中所示的顺序, 在室温下将反应组装在无核酸酶的PCR管中进行孵育。

Reagent	Volume
Nuclease-free water	8μl
10X Reaction Buffer	1μl

Target ssRNA (60nM)	1µl
LwaCas13a/crRNA complex (from step 1b)	10µl
Total volume	20µl

用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀，室温离心数秒，使液体积聚于管底，37°C孵育30分钟。

- d. 加入1µl Proteinase K (20mg/ml) (ST533)，室温10分钟以终止反应。
- e. 加入4µl DNA上样缓冲液(6X) (D0071)，进行琼脂糖凝胶电泳或者检测。

2. 核酸检测实验(以ELISA为例)。

- a. 溶解并混匀核酸检测反应所需的各种溶液。将LwaCas13a、crRNA、靶标ssRNA及荧光报告探针(Quenched Fluorescent RNA Reporter)置于冰上，使用无核酸酶水稀释crRNA至400nM，靶标ssRNA至60nM，荧光报告探针至2µM。用无核酸酶水稀释适量10X Reaction Buffer至1X Reaction Buffer。LwaCas13a (35µM)推荐使用1X Reaction Buffer稀释至LwaCas13a (1µM)备用，稀释后宜尽快使用，不能冻存后使用，以避免反复冻融导致酶活性下降。无核酸酶水推荐使用BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile) (ST876)。

- b. 室温下按照下表中的顺序设置反应体系。

Reagent	Volume
Nuclease-free water	7µl
10X Reaction Buffer	1µl
crRNA (400nM)	1µl
LwaCas13a (1µM)	1µl
RNase Inhibitor (40U/µl)	0.5µl
Total volume	10µl

用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀，室温离心数秒，使液体积聚于管底，37°C预孵育10分钟。

- c. 室温下按照下表中所示的顺序设置反应体系(推荐使用碧云天的FCP966 BeyoGold™全黑96孔细胞培养板)。

Reagent	Volume
Nuclease-free water	30µl
10X Reaction Buffer	4µl
Target ssRNA (60nM)	1µl
LwaCas13a/crRNA complex (from step 2b)	10µl
Quenched Fluorescent RNA Reporter (2µM)	5µl
Total volume	50µl

用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀，室温离心数秒，使液体积聚于管底，37°C孵育30分钟。

- d. 孵育后，使用荧光酶标仪读取荧光强度(激发波长：494nm；发射波长518nm)。
(也可通过实时荧光定量PCR仪检测荧光信号，37°C反应，每30秒-1分钟采集一次荧光信号。)

常见问题：

1. 常见的Cas13酶有哪些？它们之间有哪些不同点？

Cas13包括Cas13a、Cas13b、Cas13c、Cas13d，其中Cas13c的研究目前尚不充分，其它三种Cas13均有比较广泛的研究和运用。Cas13a和Cas13c的spacer区在crRNA的3'端；Cas13b的spacer区在crRNA的5'端，并且Cas13b能够同时靶向多个RNA转录本，更适用于微调基因功能；而Cas13d比其他Cas13效率更高、脱靶率更低、尺寸更小，仅有2.8kb大小，可以轻松包装到容量有限的载体中，因此具有更好的递送优势和应用前景。

2. Cas9、Cas12a和Cas13a有何区别？

	Cas9	Cas12a	Cas13a
Classification	Class II Type II	Class II Type V	Class II Type VI
Nuclease Domains	RuvC and HNH	RuvC	HEPN × 2
Guide RNA	crRNA and tracrRNA	crRNA	crRNA
PAM Sequence	5'-NGG-3'	5'-TTN-3'	/
Cis-Cleavage Target	dsDNA with PAM	dsDNA with PAM or ssDNA	ssRNA
Trans-Cleavage Target	/	ssDNA	ssRNA

3. 如何设计LwaCas13a的crRNA？

LwaCas13a的直接重复(Direct repeat, DR)序列为：GATTTAGACTACCCCAAAAACGAAGGGGGACTAAAAC。

LwaCas13a的crRNA的设计可参照以下序列：

5'–GAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGGACUAAAACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN–3'，(无下划线序列为DR区，下划线序列为crRNA与特异靶标序列互补配对的spacer区，建议spacer区长度为28nt)。

推荐使用crRNA在线设计网站：Guide design resources — Zhang Lab (squarespace.com)

参考文献：

1. Perč ulija V, Lin J, Zhang B, Ouyang S. Adv Sci (Weinh). 2021. 8(13):2004685.
2. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, et al. Nat Rev Microbiol. 2015. 13(11):722-36.
3. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P, Han S, Joung J, et al. Nature. 2017. 550(7675):280-284.
4. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, et al. Science. 2017. 356(6336):438-442.

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