

spCas9 重组蛋白

产 品	货号	浓 度	规 格
spCas9 重组蛋白	91010	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (无甘油)	10 μg (10 μl)
	91025		25 μg (25 μl)
	91011	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (有 50%甘油)	10 μg (10 μl)
	91026		25 μg (25 μl)
	91100	5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (无甘油)	100 μg (20 μl)
	91500		500 μg (100 μl)
	91101	5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (有 50%甘油)	100 μg (20 μl)
	91501		500 μg (100 μl)

储存：-20 °C 储存

背景介绍：

CRISPR/Cas(CRISPR-Associated)是一种由 RNA 指导 Cas 核酸酶对靶向基因进行特定 DNA 修饰的技术。它是细菌和古细菌为应对噬菌体和质粒不断攻击而演化来的获得性免疫防御机制。来自 *Streptococcus pyogenes* 的 CRISPR/Cas9 系统只需单个蛋白，应用最为广泛。通过人工优化的具有引导作用的 gRNA (guide RNA) 引导核酸酶 Cas9 蛋白在与 gRNA 配对的靶位点处剪切双链 DNA，引起 DNA 双链断裂 (DSB)，进而利用生物体内非同源末端修复机制 (NHEJ) 或同源重组机制 (HR) 修复 DNA，导致基因移码突变、替换或删除，在模板 DNA 引入的情况下还可以特异性插入目的片段。CRISPR/Cas9 系统已经成功应用于植物、细菌、酵母、鱼类及哺乳动物细胞，是目前最高效的基因组编辑工具。

相比较与以前常用的由质粒介导表达或者 mRNA 注射导入 Cas9 蛋白的方法，近年来的研究发现直接用 Cas9 蛋白与 gRNA 形成 RNP 复合体之后通过注射、转染或电转等方法导入细胞或胚胎内，可以更快的发生基因编辑，并能显著降低脱靶率和减少细胞毒性，是目前被广泛认可的更方便高效的基因编辑手段。Sudgen 提供的重组 Cas9 蛋白是高度纯化的 *Streptococcus pyogenes* 野生型蛋白，C 端带有细胞核定位序列(NLS)帮助 Cas9 核酸酶进入细胞核进行基因编辑。Cas9 蛋白也可用于体外剪切基因组 DNA 验证 gRNA 的有效性，节省体内预实验所需时间。

产品简介：

- 野生型 spCas9 重组蛋白；
- C 端带有细胞核定位序列 NLS；
- 无 RNA 酶污染；
- 高度纯化，纯度 95%左右；
- 高活性，可与 2 个或以上 gRNA 结合注射，高效切除大片段 DNA；
- 可用于体外编辑、小鼠、斑马鱼、果蝇胚胎等 Cas9 蛋白复合体注射；
- 适用于细胞转染或电转；
- 提供 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 和 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 两种蛋白浓度保存于缓冲液中；

储存缓冲液: 20 mM Hepes (pH 7.5), 150mM KCl, 1mM DTT

实验方法参考:

1. 体外 DNA 编辑:

- 1) PCR 扩增目的基因片段;
- 2) 订购合成 gRNA 或者体外转录 gRNA;
- 3) 按下表混合组分:

10 X reaction buffer: 200 mM Hepes (pH7.5), 100 mM MgCl₂, 1.5 M KCl, 5 mM DTT

10 X reaction buffer	2 μ l
gRNA	0.5 μ g
1 μ g/ μ l Cas9 protein	1 μ l (1 μ g)
RNase-free H ₂ O	X μ l
室温放置预混合 10 分钟	
Template DNA	100 ng
Total volume	20 μ l
37°C 反应 1 小时	
10 mg/ml RNase A 1 μ l, 37°C, 10 分钟 (可选)	

4) 琼脂糖凝胶电泳分析酶切结果。

2. 斑马鱼胚胎 RNP 注射:

在 DEPC 处理过的水中预混合稀释 gRNA 与 Cas9 蛋白, 室温放置 10 分钟, 每个 1 细胞斑马鱼胚胎中注射 100-200 pg gRNA 与 1 ng Cas9 蛋白的 RNP 复合物。F0 代即可获得突变体表型。

3. 小鼠胚胎 RNP 注射:

预混合 5-20 ng/ μ l gRNA 与 5-20 ng/ μ l Cas9 蛋白, 室温放置 10 分钟形成 RNP, 显微注射小鼠受精卵胞质或雄原核。

4. 小鼠胚胎 RNP 批量电转染:

相对于小鼠单胚胎 Cas9 RNP 注射, Cas9 RNP 电转小鼠胚胎可一次性电转 60 枚胚胎, 电转后高达 90% 的存活率, 一次胚胎移植即可获得目的基因的各种基因编辑系, 操作简便高效, 技术要求低, 重复性好, 表型验证更可靠。具体实验步骤可参考文献 (1)。

5. 体外培养细胞的基因编辑:

Sudgen Cas9 蛋白与 gRNA 形成的 RNP 可用 Sudgen LipoMax 转染试剂转入真核细胞, 与构建的 Cas9 质粒转染相比编辑效率更高, 脱靶率更低, 细胞毒性低。

以 24 孔板的一孔细胞转染为例 (转染时细胞密度在 30-70% 之间):

- a) 在 25 μ l Opti-MEM 中加入 1 μ g Cas9 蛋白, 200 ng gRNA, 均匀混合;
- b) 在 25 μ l Opti-MEM 中加入 2.5 μ l LipoMax, 均匀混合;
- c) 室温放置 5 分钟;
- d) 混合 a) 与 b), 室温放置 15 分钟;
- e) 加入细胞培养基中;
- f) 第二天更换新鲜的培养基;

g) 48 小时后收集细胞，提取基因组 DNA 进行剪切鉴定。

备注：

- 蛋白收到后储存在-20°C，第一次融化后，根据需要可分装冻存，避免多次反复冻融；
- 所有 Cas9 蛋白的相关操作要在无 RNA 酶条件下进行，包括试管，移液器吸头，水和缓冲液等。胚胎注射或细胞转染还需无菌操作；
- Cas9 蛋白的实际应用应根据具体物种与实验要求调整，以上方法仅供参考。

参考文献：

1. Modzelewski AJ, Chen S, Willis BJ, Lloyd KCK, Wood JA, He L.

Efficient mouse genome engineering by CRISPR-EZ technology. Nat Protoc. 2018 Jun; 13 (6):1253-1274.