

#A10040

CRISPR-Cas9 Protein

(高效型基因编辑核酸酶)

- 100 ug
- 200 ug



Order 021-34695924
orders@ab-mart.com

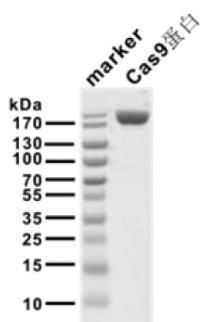
Support 400-6123-828
support1@ab-mart.com

Web www.abmart.cn

产品描述

特性及规格:

目的蛋白的氨基酸序列是来源于化脓性链球菌 *Streptococcus pyogenes* 菌种天然的 Cas9 蛋白的氨基酸序列 (NCBI GenBank: WP_010922251)。为实现 PR002 蛋白在真核细胞中入核进行基因编辑, 在其 N 和 C 端分别加上 SV40 进核信号 (SV40.NLS) 和 Nuclear 进核信号 (Nucleoplasmin.NLS)。上述氨基酸序列进行大肠杆菌偏爱的密码子优化并获得对应核苷酸序列, 利用大肠杆菌系统进行蛋白表达。



存储	含40%甘油缓冲液, -80°C保存长期稳定
分子量	160896.48/mol
蛋白浓度	1mg/ml
SDS-PAGE 纯度	>97%
内毒素	<10 eu/mg

编号	检测项目	检测方法	质量标准	检测结果	结果判定
1	外观	目测	应为无色澄明液体	无色澄明液体	符合标准
2	酸碱度	pH 计	6.50±0.50	6.61	符合标准
3	纯度 (SEC-HPLC)	HPLC	主峰纯度 ≥95.00%	99.70%	符合标准
4	纯度 (RP-HPLC)	HPLC	主峰纯度≥95.00%	100.00%	符合标准
5	蛋白含量 (mg/ml)	紫外分光光度计	10.00mg/ml±10%	9.81	符合标准
6	体外活性 (1pmol Cas9)	琼脂糖凝胶电泳	≥80.00% (1pmol Cas9)	86.70%	符合标准
7	纯度 (SDS-PAGE)	SDS-PAGE 电泳	≥95.00%	100.00%	符合标准
8	Western-Blot 鉴别	WesternBlot	应为阳性	阳性	符合标准
9	内毒素	凝胶法	<10EU/mg	<5EU/mg	符合标准
10	无菌检查	膜过滤法	应无菌	无细菌生长	符合标准
11	E. coli 宿主蛋白残留量	ELISA	<0.10%	0.00%	符合标准
12	DNase 残留量	qPCR Kit	<LOQ (0.05U/μl)	<LOQ	符合标准
13	RNase 残留量	qPCR Kit	<LOQ (0.002pg/μl)	<LOQ	符合标准
14	E. coli 宿主 DNA 残留量	qPCR Kit	<50ng/ml	0.08ng/ml	符合标准

存储及操作注意事项:

- 液体蛋白在-80℃的条件下存储, 能够使蛋白长期稳定。
- 收到蛋白后, 最好是先将其分装至合适的体积, 以避免反复冻融。
- 当准备使用时, 用含有至少 20% 甘油的无核酸酶的水溶液稀释蛋白质。
- 为了保持蛋白质的稳定性, 建议用稀释缓冲液稀释蛋白质。
- 提供的所有成分均保存在无核酸酶的灭菌管中, 以避免试剂在搬运和存储过程中受到核酸酶的污染。
- 为避免分子间二硫键的形成, 建议在 Cas9 蛋白中加入终浓度 1 mM 的 DTT。

其他可能需要的仪器及试剂(根据具体实验需求选择)

仪器:

• PCR 仪, 细胞培养箱, 流式细胞仪, 琼脂糖凝胶电泳系统, 聚丙烯酰胺凝胶电泳系统, 蛋白转膜系统, 水浴锅, 紫外分光光度计, 电转仪系统, 凝胶成像系统, 显微镜。

试剂耗材:

• 细胞培养基, 血清, 低糖培养基, 细胞转染试剂, PBS 缓冲液, TE 缓冲液, 10×Cas9 反应缓冲液, T7 体外转录试剂盒, PCR 扩增试剂(如 Q5, Tag 等), 合成引物。

实验准备:

sgRNA 制备(体外转录)

1) sgRNA 设计网站如下:

- <http://chopchop.cbu.uib.no/>
- <http://crispr.mit.edu/>
- <http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design>

或者使用其他 sgRNA 设计网站

注: 通常活性指数并没有很好的预测性和准确性, 所以不要依赖这些数值, 但是 off-target 的数值可作参考。

2) sgRNA 引物合成

名称	序列	引物合成方式
正向引物	aagc (N19) GTTTTAGAGCTAGAAATAG	DSL
通用反向引物	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTAT TTAACTTGCTATTCTAGCTCTAAAAC	hPage

注: N19 为 2.1.1 中查得的 guide 序列

3) 合成 sgRNA 转录模板

反应溶液的制备:

试剂	体积
Q5 2X MIX	10 μL
正向引物(10uM)	1 μL
通用反向引物(10uM)	1 μL
ddH2O	8 μL
Total	20 μL

PCR 条件:

反应体系		反应条件	
模板 PCR 产物	8 μ L	冰水操作	
NTP Mix	10 μ L		
T7 转录酶	2 μ L		
Total	20 μ L	37 $^{\circ}$ C	2-4 h
DNAase I	1 μ L	37 $^{\circ}$ C	15 min

sgRNA 纯化（这里提供磁珠吸附的方法，也可以采取其他方法进行纯化）

- 1) 将磁珠(Beckman, A63987)从冰箱取出后上下颠倒 8~10 次，并且多次震荡，直到所有磁珠都充分悬浮（在瓶/管底部没有聚集的磁珠）。
- 2) 在 sgRNA 产物中加入 1.8 倍体积的磁珠（例如 10 μ L 产品加入 18 μ L 磁珠），并在室温下孵育 5-10 分钟。将小管放置在磁性分离器上 2 分钟。吸出上清液，将管（或管带）留在磁性分离器上。
- 3) 加 200 μ L 80%乙醇洗珠，保持管（或管带）在磁性分离器上（无需搅拌）重复乙醇清洗步骤。
- 4) 清洗结束后，风干 5 分钟。加入 100 μ L RNAase free 水，拌匀，室温下放置 2-5 分钟，保持管远离磁性分离器。
- 5) 将管（或管带）放在磁性分离器上 1~2 分钟，或直到珠子被磁铁吸附。将带有 sgRNA 的上清液转移到新的管中（尽量不要吸到磁珠）。
- 6) 使用分光光度计测定 sgRNA 的浓度。选择 RNA 浓度测量程序，加载 1.5 到 2 μ L 空白对照及样品，测量后记录浓度。

crRNA 和 tracrRNA 的制备

如果不是选用 sgRNA，而是用 crRNA 和 tracrRNA 系统，使用前需要将两段 RNA 进行退火处理。

反应体系:

crRNA(100 μ M)	10 μ L
tracrRNA (100 μ M)	10 μ L
5 \times 退火缓冲液 (10uM)	10 μ L
ddH ₂ O	20 μ L
Total	50 μ L

退火反应条件:

95 $^{\circ}$ C	5min	
95 $^{\circ}$ C		} -2 $^{\circ}$ C/second
78 $^{\circ}$ C		
78 $^{\circ}$ C	10min	
78 $^{\circ}$ C		} -0.1 $^{\circ}$ C/second
25 $^{\circ}$ C		
72 $^{\circ}$ C	2min	
12 $^{\circ}$ C	∞	

体外酶切活性测试

- 1) 合成用于检测目标基因的一对引物，要求覆盖所设计的 sgRNA 的靶向序列，扩增的基因片段长度在 400-2500bp 之间以便于后续分析。
- 2) 在室温下按下表组装反应。

组分	20 μ l 反应体系各组分体积或数量
PCR 扩增的基因片段	100 ng
10X Cas9 反应缓冲液	2 μ l
sgRNA	50 ng
Cas9 内切酶	50 ng - 250 ng
无核酸酶水	Up to 20 μ l

- 3) 于常规 PCR 仪中反应，程序为：

步骤	温度	时间
1	37°C	60 min
2	65°C	10 min
3	4°C	hold

- 4) 对反应的产物进行琼脂糖凝胶电泳仪，可以通过切开的核酸量来确定体外酶切的效率。

转染指导

化学试剂转染

以 293T 细胞和 24 孔板为例说明

- 1) 转染前一天，在 24 孔板里每孔铺 0.5x10⁵ 细胞；转染前，37° C 水浴锅温育 Opti-MEM 生长培养基（高糖 DMEM+10%FBS）；转染前 1 小时细胞可选择性的更换为新鲜生长培养基；
- 2) 稀释 500 ng Cas9 蛋白和 200 ng sgRNA 到 50 μ l Opti-MEM，室温孵育 5 分钟。向上述混合液中加入 1.5 μ l 的 EditPro（MTI-GlobalStem: GST-2184）或类似产品（依据产品说明书操作），吹打混匀，室温孵育 10 分钟，顺时针方向加入到孔内，温柔的前后摇匀孔板。
- 3) 孔板放入 37° C、5% CO₂ 培养箱内培养 24-72 小时，更换培养基或根据自己试验需要分析细胞。

电穿孔转染

以 293T 细胞和 24 孔板为例说明：

- 1) 电转前 1-2 天，细胞传代，以保证实验当天细胞密度达到 70-90%。
- 2) 转染前，37°C 温育适量的生长培养基、PBS、Opti-MEM 和 TrypLE Express，准备 24 孔板，每孔加 0.5 ml 含有 10% 血清的培养基，放到细胞培养箱内预热。
- 3) 取出培养好的细胞，吸去培养基，用 PBS 清洗后使用 TrypLE Express（或类似产品）消化收集细胞。终止消化，取适量消化后的细胞计数，计算出细胞密度。
- 4) 计算所需要的细胞总数量和所需要的细胞溶液体积，取细胞到 1.5 ml 离心管或 15 ml 锥形管，室温离心去上清，用 PBS 清洗后在室温离心去除 PBS；
- 5) 计算所需 Opti-MEM 体积，重悬细胞，以确保细胞的密度为 5 \times 10⁶ cells/mL。轻轻吹打细胞溶液获得单细胞悬液。
- 6) Cas9 蛋白+sgRNA 室温孵育 10 min。理想情况下，样品总体积不大于 2 μ l。加 12 μ l 细胞悬浮液到复合物中，轻轻地混匀。用 neon 系统（ThermoFisher MPK1025）电击细胞，设置参

数为 (1150V/20ms/2pulses)。将电击后的细胞悬液顺时针滴加到 24 孔板中。

注：如使用其他电转系统，请结合实际实验需求调整参数。

7) 转染后 48 小时更换新鲜培养基，72 小时后收集细胞。48 小时后可以检测编辑效率。

编辑效率验证指导

目标基因测序 (Tide)

1) 将野生型细胞群和编辑后的细胞群目标基因片段 (包含 sgRNA 靶点) 分别进行扩增和测序 (Sanger 法)。

2) 打开网址 <https://tide.nki.nl/>，点击 START TIDE，进入 tide 分析界面。依次输入 20 nt guide sequence (输入 PAM 区前的 20 nt 序列)、Control Sample Chromatogram (即野生型细胞目的基因测序文件，一般选取目的基因上 400~600bp 作为测序区域) 和 Test Sample Chromatogram (即 sgRNA 编辑细胞目的基因测序文件，编辑位点设在测序区域的中间为最佳)。

3) 点击 Advanced settings，调整 left boundary (通常设为 100，测序文件前 100 bp 可能有错误)、Decomposition window (即测序的比较区域，通常设为 150~600，将编辑位点包含进去)、Indel size range (先设为 50)，点击 Update View，等待结果。

4) 结果 Indel Spectrum 显示总基因编辑效率与基因敲除/插入情况，截图保存，Quantification Indel Frequencies 则显示各个长度的基因敲除/插入比例，建立表格保存数据，若 Indel size range 远小于 50，可降低范围以获得更显著的数据。

目标基因表达鉴定

推荐使用：流式细胞仪检测，WB 检测目的基因表达情况。

单克隆分选验证指导

单克隆细胞接种

1) 接种数估算：根据编辑效率和估计细胞的活力，可以估计获得一个敲除 (KO) 克隆细胞系所需的单个克隆的数量。例如，如果您想要在一个基因的二倍体中均具有突变的纯合 KO，并且 CRISPR/Cas9 产生靶序列切割效率的为 A，那么在任何一个细胞中敲除两个等位基因的可能性为 A^2 。如果插入缺失导致移码的概率为 $2/3$ (如果插入缺失为 3 的倍数则可能对原蛋白序列影响不大)，则细胞具有纯和 KO 的概率约为 $4/9 \times A^2$ 。

2) 有限稀释法：建议通过靶向 0.8 个细胞/孔来进行有限的稀释，将转染的细胞按照 8 cells/mL 的密度重悬在完全培养基中，然后在 96 孔板上的每个孔中加入 100 μ L。如果按照这种方式接种至少 N 个 96 孔板，并且预期只有 B 比例的细胞能够存活，那么获得纯和 KO 克隆的可能数目是 $42.7 \times N \times B \times A^2$ 。单细胞克隆的生存能力因细胞类型而异。一些不希望保留为单细胞的细胞需要以低密度铺板来获得分离良好的克隆，然后必须手动挑选这些克隆进行进一步的筛选。

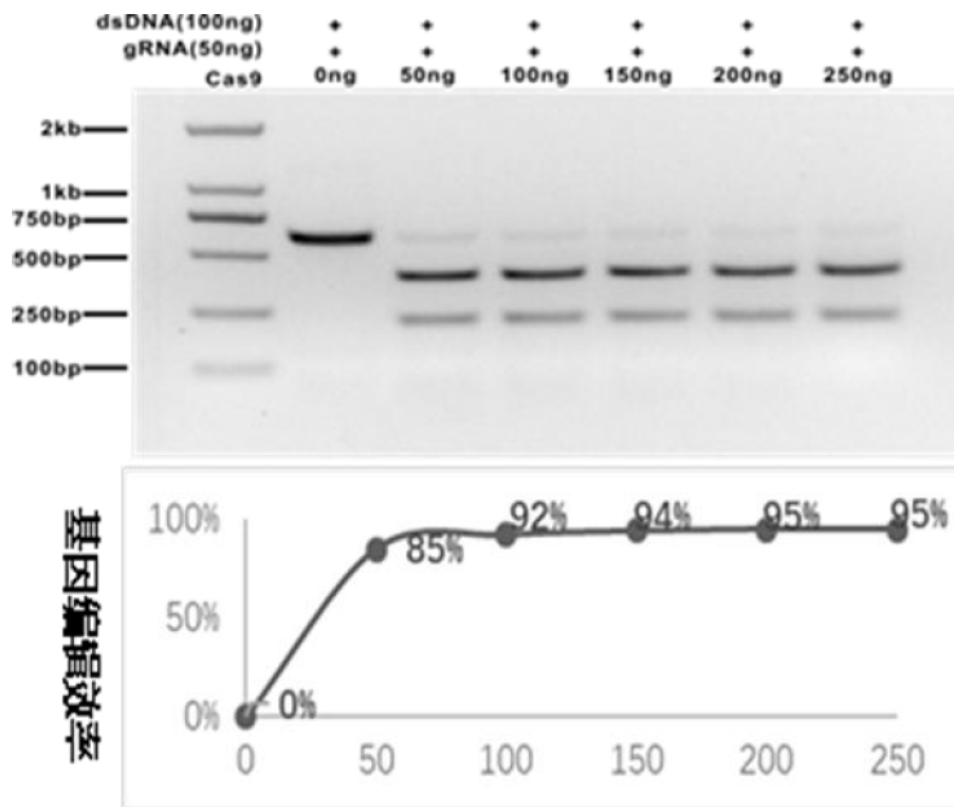
3) 流式细胞仪分选：单克隆细胞接种可以通过上述有限稀释法或是通过有单细胞分选功能的流式细胞仪来操作获得。选用后者时需要结合具体流式细胞仪的使用规范操作。

4) 单克隆细胞培养：单细胞接种后在显微镜下检查是否为单克隆状态，成功接种的进行标记，继续将平板孵育 2-3 周，以扩大克隆种群，以供进一步分析和鉴定。

单克隆验证

对收获的单克隆细胞群进行基因型分析，建议提取细胞群基因组，将酶切靶点前后各 200bp 的序列用 PCR 扩增出，进行 TA 克隆再进行测序，如果所有所测目标序列产生突变，且插入或缺失的碱基对不为 3 的倍数，则这个单克隆细胞群为纯合 KO。如果目标基因的表达可以通过抗体染色检测，也可以通过流式细胞仪进行单克隆验证，纯合 KO 中目标基因将不会表达。

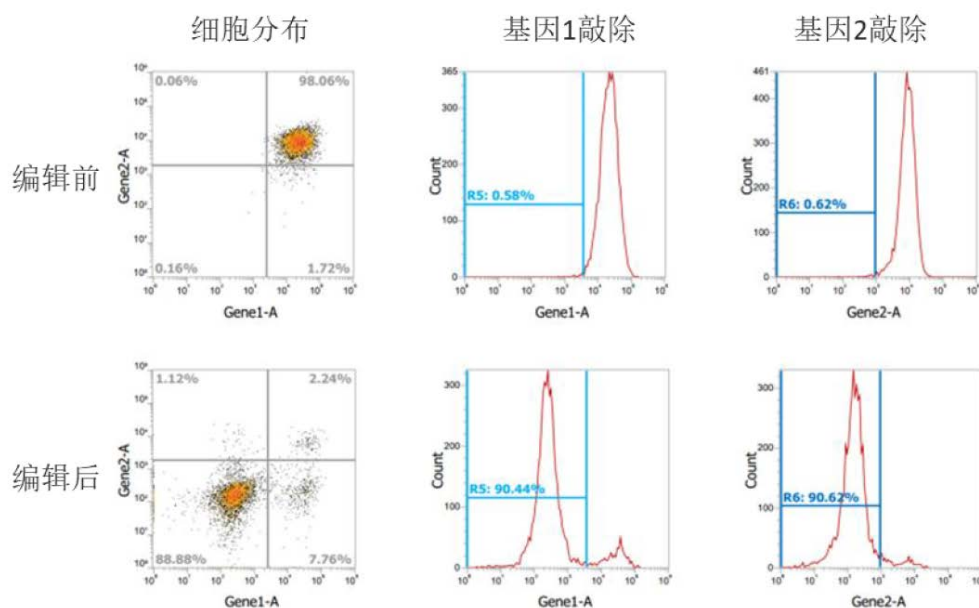
参考数据： 体外酶切图谱



Cas9/sgRNA 复合体在体外对 DNA 的高效切割

在体外重组实验中，Cas9/sgRNA 复合体加入到靶向 DNA 片段中，在低剂量即可实现饱和的切割作用，再次验证该系统的高效性。

参考数据： 体内编辑流式细胞分析图



Cas9 /sgRNA 复合体对原代细胞实现多基因编辑

对体外培养的 T 细胞通过导入 Cas9 蛋白及多种靶向基因的 sgRNA，流式细胞仪检验出多个靶向基因实现同时被高效编辑，编辑效率高达 90%，同时细胞的生长状态不受影响。