

SpCas9-GFPNuclease 说明书

【产品名称】 SpCas9-GFP Nuclease 【分子量】 195.15 KDa

【产品编号】 EDE0014 【形式】 液体

【产品简介】

Cas9 Nuclease (SpCas9)来源于*S. pyogenes* 菌株,是依赖于sgRNA 引导的 DNA 内切核酸酶,切割双链 DNA。在靶标 DNA 存在 PAM(proto-spacer adjacent motif)的情况下, Cas9 Nuclease 能在 sgRNA 引导下特异性地剪切靶标双链 DNA,使 DNA 双链断裂并生成平末端。PAM 序列对于 Cas9 识别和剪切靶标 DNA 是必需的,其剪切位点位于目标序列(target sequence)内,离 PAM 区 3 个碱基, SpCas9-GFP 转染至细胞中后可以在显微镜下观察到 SpCas9 是否进入细胞核完成基因编辑。还可应用于体外靶标 DNA 的剪切、目的片段的克隆等实验。

【产品组分】

组分	500 pmol	1000 pmol
SpCas9-GFP Nuclease (100 μ M)	100 μ M*5 μ L*1 管	100 μ M*10 μ L*1 管

【储存条件及有效期】

有效期 1 年,保存条件 -20 $^{\circ}$ C;如长期储存,建议置于 -80 $^{\circ}$ C。

建议根据使用次数进行分装,避免反复冻融。

【产品特点】

采用一步法纯化制备,最大程度保留酶活性,经过测试酶活性显著高于同类产品。

【质量保证】

样品纯度:~95% (SDS-PAGE 鉴定)。

使用 RNP 复合物电转 THP-1 细胞,展示敲除效率为 80%。



【使用说明】**一、RNP 电转实验步骤****细胞培养和铺板（以24 孔板为例）**

细胞培养至生长旺盛状态，转染前24 h，接种细胞至24 孔板，使转染时细胞融合度约为60%。请使用生长状态较好的细胞，并确保细胞无细菌、真菌或支原体污染。如果细胞是近期复苏的液氮冻存细胞，请在转染前至少传代两次。

配制 Ingenio®电转液/RNP/细胞混合液（电转前立即操作）

按下表建议，取EP 管将 Cas9-EGFP 酶和 sgRNA 混合，用枪头混匀，避免产生气泡，称为管1，室温孵育 15min。

组分	体积（uL）	终浓度
sgRNA (100μM)	1.2	1.2μM
Cas9-EGFP (100μM)	1	1 μM

注：cas9-EGFP 与sgRNA 摩尔比例为1：1，根据编辑效率、毒性和脱靶结果可适当调整至 1:1.2 -1:2

配置电转液/细胞混合液

离心细胞，使用无离子PBS 清洗细胞，去除PBS。将细胞转移至电转通用液（Ingenio® Electroporation）中，定为管2。电转液液体的总量取决于电击杯的大小。

配置电转液/细胞/RNP 混合液

取 2.2 μL RNP 混合液加入细胞悬液中轻轻吹打混匀，转移至电击杯中，不要打入气泡

注：

0.2 cm 电转杯：每杯 100 μL

0.4 cm 电转杯：每杯250 μL

转染目的细胞

根据电转仪说明书将以上复合物进行电转，电转后细胞恢复 10 min,加入预热完全培养基 100ul

将电转后的细胞转移至含 0.8 ml 预热完培的 12 孔板中培养





分析转染细胞

转染48h后，提取所转染细胞的基因组，使用特异性引物扩增靶标区域(扩增子包含sgRNA靶向切割的位置)；

使用TIDE (分析网址：<https://tide.nki.nl/>)或者ICE (分析网址：<https://ice.synthego.com/#/>，使用说明：<https://www.synthego.com/guide/how-to-use-crispr/ice-analysis-guide>)等工具进行基因编辑效率分析。

二、RNP 脂质体转染实验步骤

细胞培养和铺板（以24孔板为例）

细胞提前铺板，待细胞密度达到60%，即可进行转染操作。细胞接种数目以生长速率为基础，快速生长的细胞转染前需接种较少的细胞，以转染时观察确定细胞密度为准。

配置转染复合物

转染使用Lipofectamine3000（ThermoFisher），分为体系A和体系B，两部分分别配制，之后将二者混合后进行转染。

体系A	体积 (ul)	终浓度
sgRNA (100μM)	1.2	1.2μM
Cas9-EGFP (100μM)	1	1 μM
Opti-MEM	25	/
混匀，室温孵育 15min		
体系B	体积 (ul)	终浓度
Opti-MEM	25	/
Lipofectamine 3000	1.5	/
B液混匀，无需等待		

将A管和B管中的溶液轻柔的混合，并在室温下孵育 10 min；

转染细胞

将以上混合液均匀滴入细胞中

分析转染细胞

转染48h后，提取所转染细胞的基因组，使用特异性引物扩增靶标区域(扩



增子包含 sgRNA 靶向切割的位置);

使用TIDE (分析网址: <https://tide.nki.nl/>)或者ICE (分析网址:

<https://ice.synthego.com/#/>, 使用说明:

<https://www.synthego.com/guide/how-to-use-crispr/ice-analysis-guide>)等工具进行基因编辑效率分析。

【注意事项】

为防止 RNase 污染, 请保持实验区干净整洁, 操作时需穿戴干净的手套、口罩, 实验所用枪头、离心管等耗材均为 RNase-free。

注: 使用该产品发表文章时, 请标注我司名称 Guangzhou Editgene Co., Ltd, China

