

FnCas12a (Cpf1)

产品编号	产品名称	包装
D0510S	FnCas12a (Cpf1)	100pmol
D0510M	FnCas12a (Cpf1)	500pmol
D0510L	FnCas12a (Cpf1)	2000pmol

产品简介:

- FnCas12a, 也称为Cpf1, 是碧云天自主研发的PerfectProtein™技术平台表达、纯化获得的一种由RNA引导的可编辑DNA的重组核酸内切酶, 具有基因编辑效率高, 脱靶效率低的优点。FnCas12a来源于Francisella novicida U112, 分子量大约为154kDa。FnCas12a识别含有TTN的PAM序列, 并且FnCas12a的切割位点相对远离其识别位点为多次编辑提供了可能性, 这些特点使Cas12a与Cas9可以互为补充。只需简单将guide RNA (gRNA)与Cas12a蛋白相结合, 由于该gRNA仅含有crRNA, 无需trans-activating crRNA (tracrRNA)即可实现基因编辑的目的(图1)。
- CRISPR-Cas系统作为原核生物适应性免疫系统, 广泛存在于细菌和古细菌中, 能够保护其自身不受外源DNA或RNA的影响, 是非常常用的基因编辑工具。完整的CRISPR-Cas系统包括介导识别DNA的CRISPR RNAs (crRNAs)和介导切割DNA的Cas核酸内切酶。
- FnCas12a包含约1300个氨基酸, 含有RuvC-like结构域, 同时具有DNA和RNA内切酶的活性。研究表明, FnCas12a与Cas9由于两者结构的不同导致了其分子机制有所差异[1]。CRISPR-Cas12a系统是由Cas12a和gRNA (crRNA, 仅需约40-44个碱基)组成。FnCas12a由gRNA引导至互补链, 识别互补链上5'端短的富含T碱基(5'-TTN-3')的PAM (Protospacer adjacent motif)序列, 然后FnCas12a中的RuvC核酸内切酶结构域逐个切割互补链和靶链, 以产生交错的DNA双链断裂, 断裂发生在PAM序列3'端的约第18个碱基处, 切割产物为5'端突出4或5个碱基的粘性末端(图1)。而CRISPR-Cas9系统是由Cas9和gRNA (crRNA和tracrRNA两个RNA分子融合而成)组成, Cas9在gRNA的引导下, 识别3'端富含G碱基(5'-NGG-3')的PAM序列, 并且Cas9需要使用HNH和RuvC两个核酸酶结构域协同切割DNA, 断裂通常发生在PAM序列5'端的第3个碱基处, 最终产生平末端。

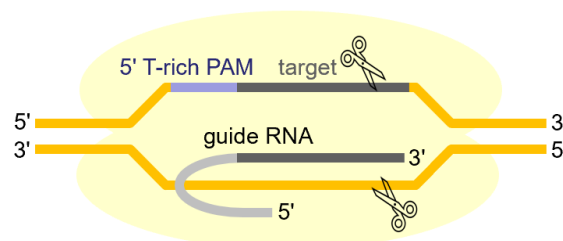


图1. 碧云天Cas12a核酸酶序列识别与DNA切割示意图。

- 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, 其可分为3种类型和12种亚型; 而第II类CRISPR-Cas系统只需单一的Cas效应蛋白即可对外源核酸序列进行识别和切割, 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, 其中众所周知的CRISPR-Cas9系统就属于第II类2型。本产品与crRNA共同组成了CRISPR-Cas12a系统, 该系统则属于第II类5型[2]。
- FnCas12a (Cpf1)酶的C端融合了核定位信号(Nuclear localization signal, NLS), NLS有助于FnCas12a进入细胞后定位至细胞核, 从而提高基因编辑的效率。
- 碧云天生产的FnCas12a (Cpf1)酶活性检测结果参考图2。

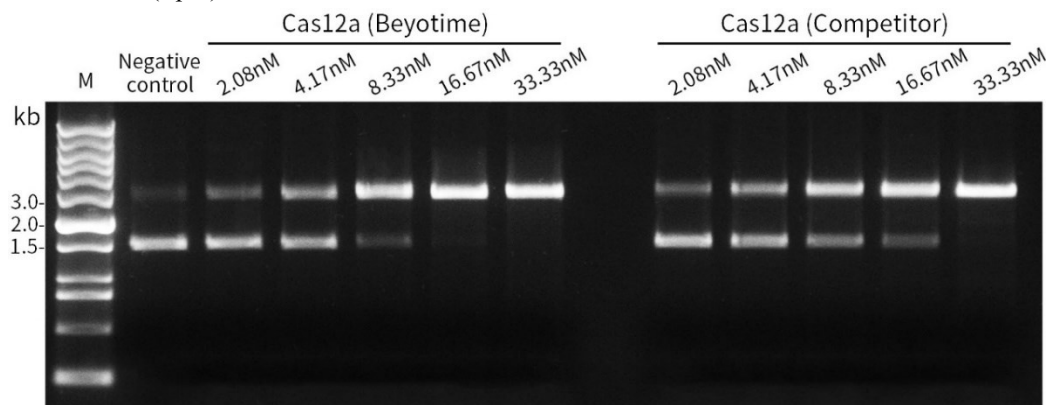


图2. 碧云天和N公司的Cas12a酶活性检测对比效果图。20 μ l水、3 μ l 10X Reaction Buffer、3 μ l 300nM gRNA (序列为UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUCUGUGUGAAAUUGUUAUCCG)、1 μ l Cas12a (浓度分别为62.5、125、250、500、1000nM, 加入体系后的终浓度为2.08、4.17、8.33、16.67、33.33nM), 在25 $^{\circ}$ C预孵育10min。然后加入3 μ l 30nM的pUC18质粒DNA形成30 μ l反应体系, 在37 $^{\circ}$ C孵育10min。加入1 μ l蛋白酶K, 室温孵育10min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。gRNA与Cas12a结合后, 将引导后者至pUC18的第479bp处产生酶切, 超螺旋的pUC18质粒被Cas12a酶切后产生线性化的pUC18, 迁移率变慢。如图2所示, 本产品与N公司的Cas12a具有相近的酶活性。实际效果会因样品、具体实验条件等的不同而存在差异, 本图仅供参考。

- **来源:** 由大肠杆菌表达, 表达基因的来源为FnCas12a。
- **用途:** 可用于基因编辑和基因检测等。线粒体或质粒DNA等双链环形DNA的线性化。
- **纯度:** 不含DNA内切酶和外切酶, 不含RNA酶。
- **浓度:** 1 μ M (153.7ng/ μ l)。
- **酶储存溶液:** 500mM NaCl, 20mM Sodium acetate, 0.1mM EDTA, 0.1mM TCEP, 50% (v/v) Glycerol, pH6 @25 $^{\circ}$ C。
- **10X Reaction Buffer:** 500mM NaCl, 100mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂·6H₂O, 1mg/mL BSA, pH7.9 @25 $^{\circ}$ C。
- **失活或抑制:** 65 $^{\circ}$ C加热10分钟失活。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D0510S-1	FnCas12a (1 μ M)	100 μ l
D0510S-2	10X Reaction Buffer	0.5ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D0510M-1	FnCas12a (1 μ M)	500 μ l
D0510M-2	10X Reaction Buffer	2ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D0510L-1	FnCas12a (1 μ M)	2ml
D0510L-2	10X Reaction Buffer	8ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20 $^{\circ}$ C保存, 至少两年有效。

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:

FnCas12a (Cpf1)体外消化靶DNA

1. 溶解并混匀体外消化反应所需的各种溶液。将FnCas12a、gRNA、底物DNA置于冰浴上, 使用无核酸酶水稀释gRNA至300nM, 底物DNA至30nM。
2. 按照下表配制反应体系(以30 μ l体系为例):

Reagent	Volume
Nuclease-free water	20 μ l
10X Reaction Buffer	3 μ l
gRNA (300 μ M)	3 μ l
FnCas12a (1 μ M)	1 μ l
Total Reaction Volume	27 μ l

3. 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀, 室温离心数秒, 使液体体积聚于管底。25 $^{\circ}$ C预孵育10min。
4. 加入3 μ l 30nM底物靶DNA (30 μ l最终体积), 轻轻混匀(用移液器轻轻吹打混匀或用涡旋混合器在最低速度轻轻混匀), 随后离心沉淀液体, 37 $^{\circ}$ C孵育10min。
5. 向每个样品中加入1 μ l蛋白酶K (ST532), 轻轻混匀, 室温孵育10min。

6. 向反应体系中加入6 μ l DNA上样缓冲液(6X) (D0071), 然后使用1%琼脂糖凝胶进行电泳分析。

参考文献:

1. Gao P, Yang H, Rajashankar KR, Huang Z, Patel DJ. Cell Res. 2016. 26(8):901-13.
2. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, et al. Nat Rev Microbiol. 2015. 13(11):722-36.

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)	4×250 μ l

Version 2021.12.15