



Общество с ограниченной ответственностью
«Биолабмикс»
ИНН 5408278957 КПП 540801001
630090, Новосибирская обл., г. Новосибирск,
ул. Инженерная, дом № 28
Tel/Fax: +7(383)363-51-91, Tel: +7(383)363-22-40
E-mail: sales@biolabmix.ru

Белок-нуклеаза Cas9-NLS

Кат. номер GE-5030, GE-5050

Описание:

Белок Cas9-NLS – это рекомбинантная эндонуклеаза Cas9 из *Streptococcus pyogenes* слитая с С-конца с повторяющимся сигналом ядерной локализации (NLS) вируса SV40 (PKKKRKV), размер белка составляет 163 кДа. Эндонуклеаза Cas9-NLS в комплексе с направляющими РНК (дуплексом crRNA:tracrRNA) или единой sgRNA осуществляет сайт-специфический гидролиз фосфодиэфирной связи в двухцепочечной ДНК. Разрыв происходит на цепи ДНК между третьим и четвертым нуклеотидами от последовательности PAM с образованием «тупых концов».

Стерильность препарата

фермента и буфера стерилизованы фильтрованием (диаметр пор 0,2 мкм). Анализ стерильности путем инкубации 50 мкл растворов на чашках Петри со средой №1 ГРМ в течение 3х суток не выявляет бактериальных колоний. При необходимости, растворы могут быть дополнительно стерилизованы, например, с помощью центрифужных концентраторов с диаметром пор 0,1-0,2 мкм, материал фильтра PES.

Область применение: геномное редактирование, технология CRISPR/Cas9.

Источник

Эндонуклеаза Cas9-NLS очищена из штамма *E.coli*, содержащего плазмиду с клонированной ДНК, состоящей из гена Cas9 и фрагментов ДНК дополнительно кодирующих с N-конца 17 аминокислот и 22 аминокислоты с С-конца. Такая конструкция позволяет синтезировать полностью функциональный белок Cas9 *Streptococcus pyogenes*, слитый с дважды повторяющимся NLS вируса SV40.

Концентрация эндонуклеазы Cas9-NLS и фасовки:

20 пмоль/мкл (20 мкМ).

Каталожный номер	Название	Количество	Объем
GE-5030	Белок-нуклеаза Cas9-NLS	300 пмоль	15 мкл
GE-5050		500 пмоль	25 мкл

Буфер хранения

Фермент находится в растворе следующего состава: 50 мМ Tris-HCl (рН 7,5 при 25°C), 300 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол, 50% глицерин.

Контроль качества

Каждая партия фермента тестируется на электрофоретическую чистоту в SDS-ПААГ, специфическую активность фермента в присутствии sgRNA в условиях *in vitro*, отсутствие неспецифической нуклеазной активности.

Буфер для проведения реакции гидролиза плазмидных ДНК *in vitro* (x5)

100 мМ HEPES (рН 7,5 при 25°C), 625 мМ KCl, 5 мМ ЭДТА, 5 мМ дитиотреитол, 30 мМ MgCl₂, 35% глицерин.

Оптимальная температура реакции: 37°C.

Условия инактивации фермента: инкубация 5 минут при 65°C.

Условия хранения и транспортировки

Хранить при температуре -20°C.

Допускается транспортирование при температуре не выше +8°C в течение суток.

Типичный протокол для трансфекции клеток с использованием Cas9-NLS на примере клеточной линии 293FT и системы «Neon™ Transfection System» (Invitrogen)¹.

1. Формирование комплекса направляющей РНК (crRNA:tracrRNA). Для гибридизации дуплекса crRNA:tracrRNA, смешайте компоненты в количестве 100 пмоль каждый (в воде) и прогрейте при 95°C в течение 5 минут, дайте раствору остыть.
2. Формирование рибонуклеопротеинового комплекса. Смешайте в пробирке направляющую РНК (100 пмоль sgRNA или комплекс crRNA:tracrRNA) и 100 пмоль Cas9-NLS в буфере для ресуспендирования (буфер R из набора «Neon™ Transfection System» компании Invitrogen). Общий объем реакционной смеси должен составлять 10 мкл. Инкубируйте смесь при комнатной температуре (20-25°C) в течение 15 минут.
3. Подготовка клеток. Свежие клетки 293FT соберите центрифугированием с использованием стандартных методов, промойте и распределите в пробирки по ~2x10⁵ клеток.
4. Осадок клеток из одной пробирки ресуспендируйте в 10 мкл смеси рибонуклеопротеинового комплекса. Вторую пробирку с клетками оставьте как отрицательный контроль, эти клетки ресуспендируйте в 10 мкл буфера R.
5. Суспензию клеток перенесите в 10 мкл наконечник для электропорации, поместите наконечник в электропоратор и дайте импульс 1450В в течение 30 мс.
6. Перенесите суспензию клеток в планшет с 500 мкл предварительно прогретой среды DMEM/F12 без антибиотиков, но содержащей 10% фетальной бычьей

¹ Neon™ Transfection System User Guide. ThermoFisher Scientific. 07.09.2021.

сыворотки. Процедуры из п.5 и 6 повторите и для клеток отрицательного контроля.

7. Инкубируйте клетки при 37°C в увлажненном CO₂-инкубаторе (5% CO₂), в течение ~48 часов.
8. Через два дня в культуре должны обнаруживаться трансфицированные клетки. Проанализируйте клетки соответствующим вашим задачам образом