

Version:

AsCas12a (Cpf1) Nuclease

产品目录号: RK20597



ABclonal | 爱博泰克

产品组分

组分名称	组分编号	浓度	规格-1 100 pmol	规格-2 1,000 pmol
AsCas12a (Cpf1) Nuclease	RM20580	10 μ M	10 μ L	100 μ L
10X Buffer CutC	RM20106	10X	1.25 mL	1.25 mL

产品说明

AsCas12a(又称 AsCpf1)是一种单独由 crRNA 引导的核酸内切酶, 其可在靶标 dsDNA 存在 PAM (序列为 TTTV, V=A/C/G)的情况下, 特异地剪切靶标 dsDNA, 使 DNA 的双链产生断裂并生成粘性末端。该酶也可在不依赖 PAM 序列的情况下, 特异地剪切 ssDNA 靶标。此外, ssDNA 或 dsDNA 靶标均可激活 AsCas12a 的反式剪切活性, 即当 AsCas12a 与 crRNA、靶标 DNA 结合形成三元复合物后, 便会被激活针对非特异序列 ssDNA 的反式剪切活性, 对体系中的任意 ssDNA 进行切割。因此, AsCas12a 可用于体外 dsDNA 的特异剪切, 也可用于靶标核酸的快速检测。

产品来源

AsCas12a (Cpf1) Nuclease 在 *E.coli* 中重组表达并经多步纯化精制而成。

保存条件

-20°C, 避免反复冻融。

活性定义

1 活性单位(U): 在总体积为 20 μ L 的 1X Buffer CutC 反应体系中, 37°C反应条件下, 1 min 内剪切 1 pmol ssDNA 探针所需的 Cas12a 的酶量。

反应条件

1X Buffer CutC, 37°C 反应

1X Buffer CutC 组成

50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 100 μ g/mL Recombinant Albumin, pH 7.9 @ 25°C

酶储存液

20 mM Sodium Acetate, 500 mM NaCl, 1 mM TCEP, 0.1 mM EDTA, 50% glycerol, pH6.0 @ 25°C

热失活

85°C 加热 5 min

操作说明

1. 顺式切割测试

1.1.冰上配制如下反应体系, 酶最后添加, 轻柔混匀后瞬时离心。

组分	使用量
10X Buffer CutC	2 μ L
10 μ M AsCas12a Nuclease	0.5 μ L
10 μ M crRNA	0.5 μ L
1 μ M Target DNA	variable*
Nuclease-Free-Water	up to 20 μ L

*对于 20 μ L 顺式剪切体系，推荐靶标 DNA 的使用量为 100 ng ~ 500 ng，且靶标 DNA 片段长度控制在 300 bp ~ 3 kb。不同长度靶标 DNA 需要的 AsCas12a 和 crRNA 的量，需要根据靶标 DNA 的摩尔量进行计算，建议保持 AsCas12a:crRNA:靶标 DNA 的摩尔比为 10:10:1，以尽量确保靶标 DNA 被切割完全。

注：顺式剪切体系中靶标 DNA 可为 ssDNA 或带 PAM 序列的 dsDNA。若采用核酸电泳检测顺式切割产物，建议使用 dsDNA 作为底物，因为 ssDNA 作为底物易被反式激活的 AsCas12a 非特异性降解，导致条带弥散。1.1 中所示反应体系可按比例放大调整。

1.2. 将上述反应置于 37°C，反应 30 min~1 h，然后 85°C 反应 5 min（使其失活），核酸电泳分析顺式剪切产物。

2. 反式切割测试

2.1. 冰上配制如下反应体系，酶最后添加，轻柔混匀后瞬时离心。

组分	使用量
10X Buffer CutC	2 μ L
10 μ M AsCas12a Nuclease	0.05~0.5 μ L
10 μ M crRNA	0.05~0.5 μ L
1 μ M Target DNA	0.5~5 μ L
10 μ M ssDNA Reporter	0.05~0.5 μ L
Nuclease-Free-Water	up to 20 μ L

注：反式剪切体系中靶标 DNA 可为 ssDNA 或带 PAM 序列的 dsDNA，该反应体系可按比例放大调整。

2.2. 置于 37°C 反应，可使用实时荧光定量 PCR 仪检测荧光信号，每 30 sec 收集一次荧光信号，反应时长按具体实验要求来定。