

AapCas12b

REF: EG23202-S/M

储存条件

-20°C保存 2 年

产品组成

组分	规格 S	规格 M
AapCas12b (10 μM)	10 μl	100 μl
10× Cas12b Buffer	1 ml	1 ml

产品简介

AapCas12b 是 Type V 亚型的 Cas 核酸酶，在 37~60°C 都具有良好活性。在 crRNA 和 tracrRNA(或两者连接形成的 sgRNA) 引导下，对双链和单链 DNA 靶标均能产生顺式切割活性 (*cis*-cleavage activity)。对于双链 DNA 靶标，AapCas12b 识别靶标 DNA 中 PAM 序列 (5'-TTN) 下游与 crRNA(或 sgRNA)spacer 序列互补的位置，特异性切割靶标双链 DNA 并生成粘性末端；对于单链 DNA 靶标，其特异性切割不依赖 PAM 序列。

AapCas12b、靶标 DNA、sgRNA 形成三元复合物后，还会产生反式切割活性 (*trans*-cleavage activity)，即非特异性切割任意序列的单链 DNA。AapCas12b 在常见的等温扩增反应缓冲液中也具有良好活性。

质量控制

蛋白纯度

使用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测，蛋白纯度不低于 95%。

核酸内切酶残留检测

将 10 pmol AapCas12b 与 200 ng 超螺旋质粒 DNA 在 37°C 温育 4 h，使用琼脂糖凝胶电泳检测，少于 10% 的质粒 DNA 转变成缺刻或线性状态。

非特异性核酸酶残留检测

将 10 pmol AapCas12b 与 15 ng 双链 DNA 片段在 37°C 温育 16 h，使用琼脂糖凝胶电泳检测双链 DNA 底物无变化。

RNase 残留检测

将 10 pmol AapCas12b 与 500 ng 总 RNA 在 37°C 温育 1 h，使用琼脂糖凝胶电泳检测超过 90% 的 RNA 仍保持完整。

宿主 DNA 残留检测

使用大肠杆菌 16S rDNA 特异性引物探针组，采用荧光定量 PCR 法检测 10 pmol AapCas12b，大肠杆菌宿主基因组 DNA 残留低于 1 copy。

失活条件

85°C 温浴 5 min。

使用方法

1. 顺式切割实验

① 在冰上配制如下反应体系：

试剂	使用量	终浓度
10× Cas12b Buffer	2 μl	1×
AapCas12b (10 μM) ^a	0.5 μl	250 nM
sgRNA (10 μM) ^a	0.5 μl	250 nM
Target DNA (1 μM) ^a	0.5 μl	25 nM
Nuclease-free water	To 20 μl	

a. 如果用凝胶电泳检测顺式切割产物，建议使用双链 DNA 作为靶标，长度在 300 bp~3 kb 之间。建议保持 AapCas12b : sgRNA : Target DNA 的摩尔比为 10:10:1，尽量确保靶标 DNA 被完全切割。

② 60°C 反应 30 min~1 h 后，85°C 孵育 5 min 灭活；

③ 使用琼脂糖凝胶电泳检测产物。为避免 AapCas12b 与 DNA 结合导致电泳异常，请确保进行热失活；若仍有电泳异常情况，可使用蛋白酶 K 对产物处理之后再行电泳分析。

2. 反式切割实验

① 在冰上配制如下反应体系：

试剂	使用量	终浓度
10× Cas12b Buffer	2 μl	1×
AapCas12b (10 μM) ^a	0.05~0.5 μl	25~250 nM
sgRNA (10 μM) ^a	0.05~0.5 μl	25~250 nM
Target DNA (1 μM) ^b	0.5~5 μl	25~250 nM
ssDNA Probe (10 μM) ^a	0.05~0.5 μl	25~250 nM
Nuclease-free water	To 20 μl	

a. 反式剪切实验中各组分的用量可以根据实验目的调整，用量较少时可先稀释成预混液。

b. 反式切割实验中的靶标 DNA 可以是单链 DNA 或带 PAM 序列的双链 DNA。

② 置于荧光定量 PCR 仪中，根据单链 DNA 探针所带荧光基团选择对应通道，60°C 恒温反应，每 30 s 为 1 个循环。循环数可设置为 30~60 个。