

Cas14a (Cas12f1) 蛋白说明书

【产品名称】 Cas14a (Cas12f1) 蛋白

【表达系统】 *E.coli* 大肠杆菌

【分子量】 62kDa

【产品内容】：

货号	CAS-14-001	CAS-14-010	CAS-14-100
Cas14a	10μM*20μL (200pmol)	10μM* 200μL (2,000pmol)	10μM *1000μl* (10,000pmol)
1X Diluent Buffer (for Cas14a)	1 ml * 1 支	1 ml * 2 支	10 ml * 1 支*
10X Reaction Buffer (for Cas14a)	1 ml * 1 支	1 ml * 4 支	10 ml * 1 支*

* 收到产品后，建议分装，以防反复冻融。

【储存条件及有效期】

本产品于-20℃保存，有效期1年

【检验原理】

Cas14a 是一种内切核酸酶，其在 tracrRNA:crRNA（或 sgRNA）的引导下，特异结合并切割靶标 ssDNA，且无需 PAM 位点。与 Cas12 类似，Cas14a 也可以结合靶标核酸并激活其 ssDNA 反式切割活性，从而被应用于靶标核酸的分子检测；与 Cas12 不同的是，Cas14a 只能结合 ssDNA 靶标，因此经过扩增富集的靶标核酸需使用 T7 核酸外切酶进行处理，且其中一条扩增引物需要使用磷酸化修饰以确保 T7 核酸外切酶仅切割其中一条链，从而留下 ssDNA 靶标链以用于 Cas14a 介导的分子检测。

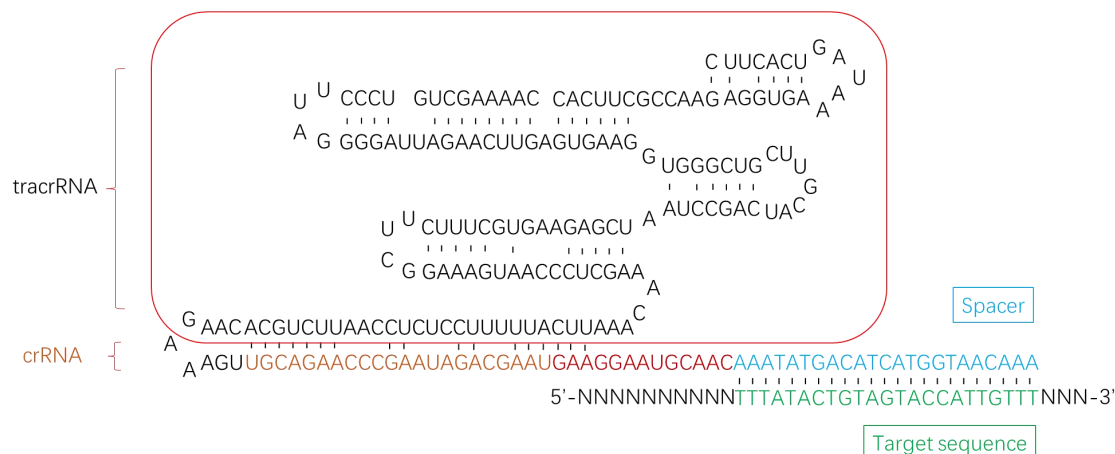
【Cas14a sgRNA】

Cas14a sgRNA 由 tracrRNA, crRNA 和 Spacer 构成。sgRNA 与 Cas14a 结合，形成功能复合物，被目标序列特异性激活。推荐搭配 CRISPR guide RNA 转录试剂盒制备 sgRNA。（Cat.: SG-RNA-001）

Cas14a sgRNA scaffold sequence 结构序列: 5'-3':

CUUCACUGAUAAAGUGGAGAACCGCUUCACCAAAAGCUGUCCCUUAGGGGAUUAGAACUUGAGU
GAAGUGGGCUGCUUGCAUCAGCCUAAUGUCGAGAAGUGCUUUCUUCGGAAGUAACCCUCGAA
ACAAAUUCAUUUUUCCUCUCCAAUUCUGCACAAGAAAGU**UGCAGAACCCGAAUAGACGAAUGAAG**
GAAUGCAAC

Cas14a(Cas12f1) sgRNA:



【应用示例】

1. 根据下表配置 Cas14a 切割反应体系：（建议冰上操作）

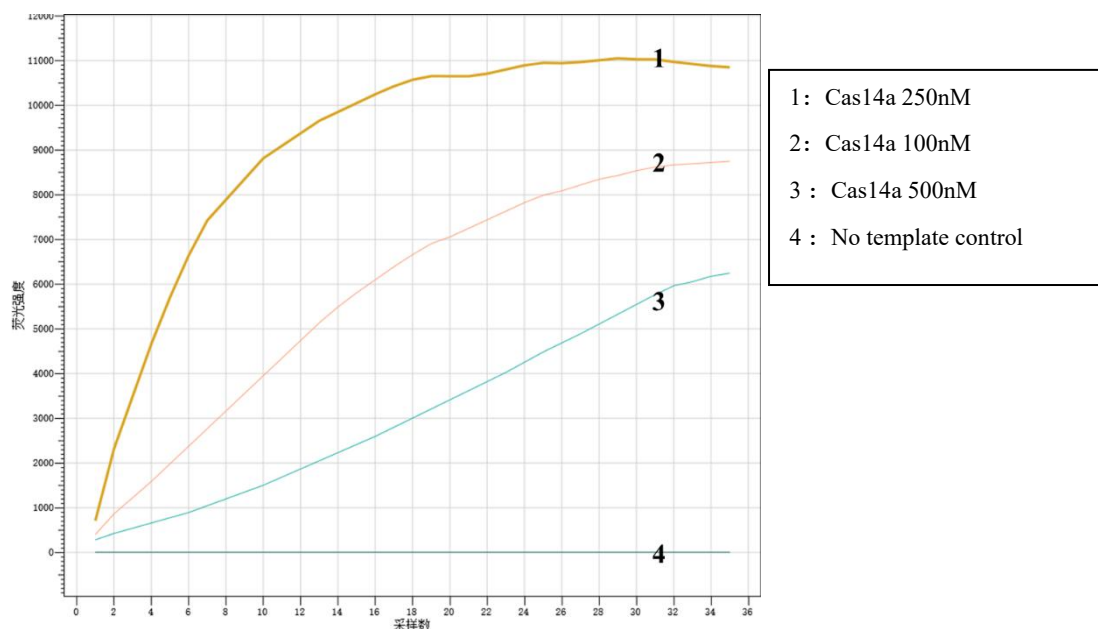
组份	用量	终浓度
10X Reaction Buffer (for Cas14a)	2 μ l	1X
Cas14a (10 μ M)*	0.05~0.5 μ l	25~250 nM
10 μ M sgRNA	0.05~0.5 μ L	25~250 nM
10 μ M Target DNA**	0.05~0.5 μ L	25~250 nM
10 μ M ssDNA Reporter (for Cas14a)	0.05~0.5 μ L	25~250 nM
Nuclease-free water	Up to 20 μ l	

*可用 1X Diluent Buffer 稀释，稀释后需立即使用。

**Target DNA 可为 ssDNA 或带 PAM 序列的 dsDNA。（crRNA、Target DNA 及 ssDNA Reporter 可用 Nuclease-free Water 稀释。对于极低浓度的 Target DNA，建议用 0.1% Tween 20 稀释并使用低吸附的离心管、吸头等耗材。）

2. 设置 Q-PCR 仪温度为 37°C，每分钟采集一次荧光信号。

【结果示例】



【注意事项】

- Cas14a 的顺式剪切(cis-cleavage): Cas14a 在 sgRNA 的引导下，特异性地剪切 target DNA。dsDNA 靶标需带有 PAM 位点，而 ssDNA 靶标不依赖 PAM 位点。
- Cas12f 的反式剪切(trans-cleavage): 当 target DNA 存在时，Cas14a/sgRNA 与 target DNA 形成复合物，Cas12f 被激发反式剪切活性，将反应体系中任意序列的单链 DNA 切割。
- 当 Cas14a 结合靶标 ssDNA 时，需使用 T7 核酸外切酶对扩增得到的靶标 dsDNA 进行消化，得到靶标 ssDNA，用于 Cas14a 介导的分子检测。（注意：其中一条扩增引物需要采用磷硫酰化修饰以确保 T7 核酸外切酶仅切割另外一条链，从而留下 ssDNA 靶标链。）
- 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。