

LbCas12a核酸酶来自毛螺菌科细菌 ND2006 (Lachnospiraceae bacterium ND2006)，是一种位点特异性 DNA 核酸内切酶，通过长度为 41-44 个核苷酸的CRISPR RNA (crRNA) 介导。靶向识别需要一段与目标位点互补的 crRNA，以及位于目标序列对侧的 DNA 链上的 5'TTTV PAM (Protospacer Adjacent Motif, V=C/A/G) 序列。LbCas12a 核酸酶的切割位点位于 PAM 序列 3' 端约第 18 个碱基处，切割产物为 5' 突出末端。LbCas12a 在其蛋白质的 N 端和 C 端都含有猿猴病毒 40 (SV40) T 抗原核定位序列 (NLS)。重组LbCas12a (Cpf1) NLS核酸酶，在大肠杆菌中表达，不含任何标签。

实验步骤:

1. LbCas12a底物制备:

将pUC57-Cas12a质粒ScaI完全酶切后回收，稀释至40ng/ul待用;

2. 用Nuclease-free water对crRNA, LbCas12a (Cpf1) NLS进行稀释，分别稀释至1 μM;

crRNA 序列 (5'→3'): UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUGUCUAGUGUGGCCACUUGUG

3. 分别加入:

组分	体积	终浓度
10x Buffer	3 μl	1x
LbCas12a (Cpf1) NLS(10 μM)	3 μl	1 μM
crRNA (10 μM)	3 μl	1 μM
Nuclease-free water	补水至	23 μl

4. 25 °C，孵育10min;

5. 加入酶切底物 (40ng/ul) 7ul，轻离，混匀;

6. 37 °C，孵育20min;

7. 65°C, 10min热失活后，电泳检测切割效率。

注意事项

为防止 RNase 污染，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。