

Vaccinia Capping System 产品说明书

产品信息

产品名称	Cat#	规格
Vaccinia Capping System	K111A01	10 rxns
	K111A02	20 rxns
	K111A03	50 rxns
	K111A04	100 rxns

产品描述

牛痘病毒加帽体系利用牛痘病毒加帽酶及相关组分, 将 7-甲基鸟苷帽结构 (m7Gppp, Cap0) 加到 RNA 的 5' 末端。在真核生物中, 该结构与 mRNA 的稳定、转运和翻译密切相关。使用酶促反应为 RNA 加帽是一种简单有效的方法, 且帽结构与天然 Cap 0 结构完全一致, 能显著改善用于体外转录、转染和显微注射的 RNA 的稳定性和翻译能力。该酶由两个亚基 (D1 和 D12) 组成, 兼具 RNA 三磷酸酶、鸟苷转移酶和鸟嘌呤甲基转移酶的功能, 它们对于添加一个完整的 Cap 0 结构 m7Gppp5' N 都是必须的。

由牛痘病毒加帽酶构建的带帽 RNA 产品具有 Cap 0 结构。通过在加帽反应中同时使用 mRNA Cap 2'-O-甲基转移酶和牛痘病毒加帽酶, Cap 0-RNA 可以转化为“Cap 1”结构。mRNA Cap 2'-O-甲基转移酶通过将甲基从供体分子 SAM 转移到 Cap 0- RNA 5'端紧邻帽结构的第一个核苷酸的 2'-O 位置, 从而从 Cap 0-RNA 制备 Cap 1-RNA。

产品组分

组分	10 rxns	20 rxns	50 rxns	100 rxns
Vaccinia Capping Enzyme (10U/μL)	40 μL	80 μL	200 μL	400 μL
mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase (100 U/μL)	40 μL	80 μL	200 μL	400 μL
SAM (20 mM)	25 μL	50 μL	125 μL	250 μL
10 mM GTP	100 μL	200 μL	500 μL	1 mL
RNase Inhibitor (40 U/μL)	25 μL	50 μL	125 μL	250 μL
10 × Capping Buffer	100 μL	200 μL	500 μL	1 mL
RNase Free Water	1 mL × 2	1 mL × 3	1 mL × 4	1 mL × 8

实验流程

1、加帽反应 (反应体系 100μL)

本步骤适用于 50μg RNA (≥100 nt) 的加帽反应, 且可根据实验需要放大。

1) 用 RNase-free water 将适量 RNA 稀释至 67μL;

- 2) 将 RNA 置于 65℃ 加热 5min，结束后冰上放置 5min；
- 3) 依次加入以下各组分：

组分	加量
Denatured RNA	67 μ L
10×Capping Buffer	10 μ L
GTP (10 mM)	10 μ L
SAM (20mM)	2.5 μ L
RNase Inhibitor (40 U/ μ L)	2.5 μ L
mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase (100 U/ μ L)	4 μ L
Vaccinia Capping Enzyme (10U/ μ L)	4 μ L

- 4) 37℃ 反应 30 min。RNA 加帽完成，可进行后续实验。

运输和储存

-20 ± 5℃ 保存，有效期为 12 个月。运输条件：≤0℃。

注意事项

- ◆ RNA：在加帽体系使用之前，应将体外转录反应产生的 RNA 进行纯化并溶解于 RNase-free 水中，不能将 RNA 溶解在 EDTA 溶液或其他盐溶液中。
- ◆ SAM：SAM 在 pH 7-8，37℃ 条件下不稳定，为避免 SAM 降解，该工作液需要保存于冰上。
- ◆ RNA 二级结构：一些 RNA 转录本可能形成稳定的二级结构（同源二聚体和发卡结构），如二级结构发生在转录本的 5'端会影响加帽效率。在与加帽酶反应之前加热 RNA 可以去除转录产物 5'端的二级结构，如果转录产物的 5'端结构复杂，可以把加热时间延长至 10min，加帽反应时间可延长至 60min。
- ◆ Cap 0-和 Cap 1-mRNA：Cap 0-和 Cap 1-mRNA 之间的差异在 RNA 5'端紧邻帽结构的第一位核苷酸(N1)是否具有 2'-O-甲基。在高等真核细胞中，该甲基化是天然加帽过程的一部分，Cap 1 结构提高了 mRNA 的翻译效率。
- ◆ 在配制反应体系时，可以加入 0.5 μ L RNase inhibitor，同时去掉等体积的 RNase-free Water。