

Vaccinia Capping Enzyme 产品说明书

产品信息

产品名称	Cat#	规格
Vaccinia Capping Enzyme, 10U/μL	M104A01	50 μL
	M104A02	100 μL
	M104A03	200 μL
	M104A04	500 μL

产品描述

Vaccinia Capping Enzyme 可用于 T7 RNA 聚合酶催化的体外转录反应产生的 RNA 的加帽反应。真核生物中，mRNA 经转录后修饰在 5'端形成一个特殊的帽子结构(m7Gppp5'N)，此结构与 mRNA 的稳定性、转运(出核)和翻译紧密相关。通过酶促反应为 RNA 加帽是一种简单有效的方法，能够显著改善体外转录的用于转染和显微注射的 RNA 的稳定性和翻译能力。牛痘病毒加帽酶(Vaccinia Capping Enzyme)由两个亚基(D1, D12)组成，兼具 RNA 三磷酸酯酶活性、鸟苷酰基转移酶活性和鸟嘌呤甲基转移酶活性，它们对于添加一个完全的 Cap0 结构都是必须的。在合适浓度的 S-腺苷甲硫氨酸(S-Adenosylmethionine, SAM)，鸟苷三磷酸(GTP)等条件存在下，牛痘病毒加帽酶能够将帽子结构(m7Gppp, Cap0)加到 RNA 5'端。基于本酶促反应，加帽效率可接近 100%，并且保证帽子结构方向正确。

本制品为 GMP 级重组 Vaccinia Capping Enzyme，生产过程中对宿主蛋白、外源 DNA、RNase 等工艺相关杂质，以及微生物限度、细菌内毒素进行严格控制。整个生产过程不使用、添加氨苄青霉素和任何动物来源的原料及辅料，采用符合 GMP 规范的产品生产与质量管理规范，保障生产过程以及原辅料可追溯，产品满足 mRNA 疫苗生产等领域对原辅料的要求。

活性单位定义

37℃，pH 8.0 条件下，1 小时内使 10 pmol [α -32 P] GTP 掺入 80 nt 寡核苷酸转录产物所需要的酶量定义为 1 个活性单位。

储存缓冲液

50 mM Tris-HCl (25℃, pH 8.0), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% Triton X-100, 50% Glycerol

适用范围

可用于体外转录后，体内或体外翻译前 mRNA 的加帽反应和 5'末端标记反应。

实验流程

- 1、将所有实验材料从-20℃拿出，置于冰盒上解冻，振荡混匀，短暂离心收集液体于管底，置于冰盒备用，将 RNA 进行热变性，65℃加热 5 min，冰上放置 5 min。
- 2、配制反应体系（20 μL）

组分	浓度	用量
10 × Capping Buffer (GMP Grade)	10 ×	2 μL
Vaccinia Capping Enzyme (10 U/μL, GMP Grade)	10 U/μL	1 μL

GTP Solution	10 mM	1 μ L
SAM	2 mM	1 μ L
Denatured RNA	10 μ M	10 μ g
RNase-free water	10 μ M	Up to 20 μ L

3、上述体系充分混匀后，37℃，30，min。

4、加帽后的 RNA 经过纯化、质控合格后，可用于后续工艺或实验。

***注**

1、加帽反应效率受 RNA 5'端结构影响，因此建议通过热变性(65℃加热 5 min，冰上放置 5 min)打开 RNA 5'端的高级结构。变性条件可根据 RNA 5'端结构复杂程度进行调整，若 5'端无高级结构，本步骤可省略。

2、加帽率与投入 RNA 长度、物质的量均相关，建议先在推荐体系下设置 Vaccinia Capping Enzyme 用量梯度确认特定孵育条件下的合适用量。

3、本加帽反应一般可以在 30 min 内完成，加帽效率与时间呈正比，若 RNA 5'端结构复杂或 RNA 长度较短(≤ 200 nt)，可延长反应时间至 60 min。

4、酶制品中均含有甘油成分，建议体系中两个酶制品添加总体积不超过反应体积的 1/5，使用中建议反复冻融不超过 6 次。

5、SAM 在实验条件下不稳定，需要在反应开始前新鲜配置。为避免 SAM 降解，该工作液需要始终放置于冰上。

6、反应体系中可添加 RNA 酶抑制剂防止 RNase 污染，建议使用浓度 1 - 2 U/ μ L。

7、经本制品 Cap0 加帽的 RNA 可以通过 Cap 2'O-Methyltransferase 甲基化形成 Cap1 RNA。两步加帽反应也可同时进行，反应体系参考 Cap 2'O-Methyltransferase 说明书。

8、经本制品 Cap1 加帽的 RNA 可以通过 Poly(A)聚合酶在 3'端加上 Poly(A) 序列，形成完整的 mRNA，用于后续转染实验或者体外翻译实验；若转录模板本身带有可转录形成 Poly(A)的序列，则无需进行加尾。

运输和储存

-20 $\pm$ 5℃保存，有效期为 12 个月。运输条件： $\leq 0^\circ\text{C}$ 。

注意事项

- ◆ 可室温溶解，溶解后宜存放于冰盒内或冰浴上，使用完毕后宜立即置于-20℃ 保存。
- ◆ 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

