

Cap 2'-O-Methyltransferase 产品说明书

产品信息

产品名称	Cat#	规格
Cap 2'-O-Methyltransferase, 50U/μL,	M105A01	50 μL
	M105A02	100 μL
	M105A03	200 μL
	M105A04	500 μL

产品描述

Cap 2'-O-Methyltransferase(2'氧甲基转移酶)为E.coli 重组表达的牛痘病毒 DNA 编码的一种甲基转移酶。该酶利用 S-腺苷甲硫氨酸(S-Adenosylmethionine, SAM)为甲基供体, 在 RNA 5'端紧邻帽结构(Cap0)的第一个核苷酸的 2'-O 位点添加甲基基团, 形成带有 Cap1 结构的 mRNA。Cap1 结构能够增强 mRNA 的翻译效率, 并且降低 mRNA 结构本身的免疫原性, 因此有助于改善 mRNA 转染后编码蛋白的表达水平。2'氧甲基转移酶特异性识别 7- 甲基鸟苷帽结构(m7Gppp, Cap0), 不会作用于 5'端为 pN, ppN, pppN 或 GpppN 的 RNA。带有 Cap0 结构的 RNA 可用 Vaccinia Capping Enzyme 制备。

本制品为 GMP 级重组 Cap 2'-O-Methyltransferase, 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°C, pH 8.0 条件下, 1 小时内使 10 pmol 80 nt 带有 m7Gppp 帽结构的寡核苷酸转录产物甲基化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°C, pH 8.0), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% Triton X-100, 50% Glycerol

适用范围

Cap0 结构的 2'-O 甲基化, 提高 mRNA 转染后的翻译表达效率, 并降低 mRNA 在体内的免疫原性。

实验流程

- 1、将所有实验材料从-20°C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°C加热 5 min, 冰上放置 5 min。
- 2、根据不同的技术路线配置合适的反应体系:

分步加帽体系 (20 μL/反应)

组分	浓度	用量
10 × Capping Buffer (GMP Grade)	10 ×	2 μL
Cap 2'-O-Methyltransferase (50 U/μL, GMP Grade)	50 U/μL	1 μL

SAM	4 mM	1 μ L
Denatured Cap0 RNA	10 μ M	10 μ g
RNase-free water	10 μ M	Up to 20 μ L

一步加帽体系 (20 μ L/反应)

组分	浓度	用量
10 $\times$ Capping Buffer (GMP Grade)	10 $\times$	2 μ L
Vaccinia Capping Enzyme (10 U/ μ L, GMP Grade)	10 U/ μ L	1 μ L
Cap 2'-O-Methyltransferase (50 U/ μ L, GMP Grade)	50 U/ μ L	1 μ L
GTP Solution	10 mM	1 μ L
SAM	4 mM	1 μ L
Denatured Cap0 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 $^{\circ}$ C，1 h。

4、反应所得 Cap1 RNA 经过纯化后，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 $^{\circ}$ C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，可根据 RNA 投料适当调整酶量，本加帽反应一般可以在 60 min 内完成，若 RNA 5'端结构复杂或 RNA 长度较短(≤ 200 nt)，可延长反应时间至 120 min。

3、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。

4、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。

5、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。

6、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 $^{\circ}$ C 保存，有效期为 12 个月。运输条件： $\leq 0^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 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。