

酶法加帽试剂



成为世界一流的特种酶产品与服务提供商
info@hzymes.com
www.hzymes.com

产品信息

产品名称	规格	货号
酶法加帽试剂 Cap1 capping system	50T	HBP001513

产品概述

酶法加帽试剂盒包含牛痘病毒加帽酶 (Vaccinia Capping Enzyme)、mRNA Cap 2'-O-甲基转移酶 (mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase) 及其它加帽相关组分, 可在无帽结构的 mRNA 5' 端加入 cap0 或 cap1 结构。该结构与真核生物体内天然帽结构完全一致, 可显著降低外源 mRNA 的免疫原性, 增强其稳定性, 并提高翻译效率。

本试剂盒中的牛痘病毒加帽酶来源于携带牛痘病毒 MR 的重组大肠杆菌, 该酶由 D1R, D12L 双亚基组成, 具有三种酶活性 (RNA 三磷酸酶活性、鸟苷酸转移酶活性和鸟嘌呤甲基转移酶活性), D1 亚基执行 RNA 三磷酸酶和鸟苷酸转移酶的功能, D12 亚基执行鸟嘌呤甲基转移酶的功能, 能特异性将 7-甲基鸟苷酸帽子结构 (Cap 0) 加至 RNA 的 5' 端。mRNA Cap 2'-O-甲基转移酶来源于携带有牛痘病毒 mRNA Cap 2'-O-甲基转移酶基因的重组大肠杆菌菌株。该酶可以利用 S-腺苷甲硫胺酸

(SAM) 作为甲基供体来甲基化加帽 RNA (Cap 0), 从而形成 Cap 1 结构, 即在 RNA 的 5' 末端紧挨帽结构的第一个核苷酸的 2'-O 位置上添加一个甲基基团。

Cap 1 加帽系统催化四种酶促反应: ① RNA 三磷酸酶将 RNA 5'-三磷酸裂解为二磷酸。② RNA 鸟苷酸转移酶将 GTP 连接到 RNA 的 5'-二磷酸。③ 鸟嘌呤 7-甲基转移酶, 使用 S-腺苷甲硫胺酸作为辅助因子, 催化鸟嘌呤的 7-氮甲基化。④ mRNA Cap 2'-O-甲基转移酶能在 Cap 0-RNA 5' 末端紧邻帽结构的第一个核苷酸的 2'-O 上添加甲基基团。

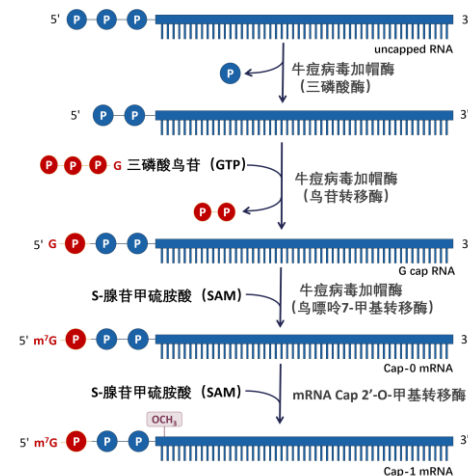


图 1. 牛痘病毒加帽酶与 mRNA Cap 2'-O-甲基转移酶参与的 mRNA 酶法加帽途径。

本试剂盒一个反应能够为 50 μ g RNA 完成加帽, 并可放大生产毫克级别的 RNA。加帽后 mRNA 翻译效率提高, 可显著改善 mRNA 在转染和显微注射实验中的表达。

产品组分

组分	浓度	体积
Vaccinia Capping Enzyme	10 U/ μ L	250 μ L
mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase	50 U/ μ L	250 μ L
SAM	32 mM	50 μ L
GTP	100 mM	50 μ L
Recombinant RNase Inhibitor	40 U/ μ L	150 μ L
10 \times Capping Buffer	/	500 μ L

运输与保存方法

$\leq 0^{\circ}\text{C}$ 运输; $-25^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$ 保存; 避免反复冻融。

储存缓冲液

20 mM Tris-HCl (pH 8.0, 25°C), 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 50% glycerol.

活性定义

Vaccinia Capping Enzyme: 在 37°C 条件下, 1 h 内将 10 pmol GTP 完全掺入到 80nt 转录产物所需的酶量定义为 1 个活性单位 (U)。

mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase: 在 37°C 条件下, 1 h 内甲基化 10 pmol 的 80nt 带帽 RNA 转录产物所需的酶量定义为一个活性单位 (U)。

实验流程

本体系适用于 50 μ g RNA 的加帽反应, 可根据实验需要按比例放大体系。

(1) 实验前计算反应所需 SAM 所需体积, 在

反应前将 32 mM SAM 用 RNase-Free Water 稀释成工作液浓度 4 mM SAM。

(2) 取 50 μ g RNA 至离心管中, 使用无核酸酶水稀释至 71.5 μ L。

(3) 65°C 加热 5 min, 然后取出冰浴 5 min 完成变性。

(4) 根据下表配制加帽体系:

组分	体积
Denatured capped RNA	71.5 μ L (50 μ g)
10 \times Capping Buffer	10 μ L
GTP (100 mM)	1 μ L
SAM (4 mM)	5 μ L
Recombinant RNase Inhibitor	2.5 μ L
Vaccinia Capping Enzyme	5 μ L
mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase	5 μ L
总体积	100 μ L

(5) 37°C 条件下孵育 1 h (对于目的片段长度小于 200 nt RNA, 可将孵育时间增加到 2 h)。

注意事项

- 为避免 RNase 污染, 请使用 RNase-free 的水、移液枪头和离心管
- 在开始实验反应之前, 需要先对 RNA 进行纯化处理并溶于无核酸酶水中, 且所有溶液均不能含任何的 EDTA 和盐离子;
- 反应前需确认 10 \times Capping Buffer 溶液澄清, 若有白色沉淀, 需要将反应缓冲液在 37°C 中孵育 5 min, 然后彻底混匀以溶解沉淀物再进行使用。

- 反应之前建议将样品 RNA 在 65°C加热 5 min，以去除转录产物 5'端上的二级结构。如果转录产物的 5'端结构复杂，可将时间延长至 10 min；
- 5'末端标记反应体系中，GTP 储液应稀释为反应体系中 mRNA 摩尔浓度的 1-3 倍。
- SAM 试剂在 pH 7-8、37°C 条件下稳定性较差，需要现用现配。此外，为防止 SAM 降解，工作液应保存于冰上。SAM 的降解会导致的 N7 甲基化效率低，进而导致加帽率降低；
- 反应体系体积可根据实际需求按比例进行放大或缩小；
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 本试剂仅作为科研或生产使用，不可直接应用于人体。