Vaccinia Capping Enzyme

DD4109-PC

Version 21.1

产品概述

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RNA5'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Vaccinia Capping Enzyme包含牛痘病毒加帽酶和其他加帽反应所需组分，可用于T7 RNA Polymerase（Vazyme #DD4101）催化的体外转录反应产生的RNA的加帽反应。

产品组分

组 分	DD4109-PC-01 (10 KU)	DD4109-PC-02 (50 KU)
Vaccinia Capping Enzyme (10 U/μl)	1 ml	5 ml

*关联产品：10 × Capping Buffer（Vazyme #DD4109R）、GTP Solution（100 mM）（Vazyme #DD4108-PA）

保存条件

-30 ~ -15℃保存，≤0℃运输。

产品信息

产品名称	Vaccinia Capping Enzyme
来源	重组*E.coli*
活性	10 U/μl
活性单位定义	37℃，pH 8.0条件下，1小时内使10 nmol [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
加帽缓冲液（1 ×）	50 mM Tris-HCl（25℃，pH 8.0），5 mM KCl，1 mM $MgCl_2$，1 mM DTT
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
储存条件	-30 ~ -15℃

适用范围

体内或体外翻译前mRNA的加帽反应和5'末端标记反应。

质量控制

项目	标准	方法
生产管理	GMP	
产品外观	澄清透明	目视检查
活性	标示值	加帽效率测定法
纯度	≥ 90%	中国药典2020版第四部SDS-PAGE法（通则0541）
核酸内切酶残留	无检出	10 U酶与pBR322 DNA 37°C孵育4小时
核酸外切酶残留	无检出	10 U酶与单链和双链DNA底物37°C孵育16小时
RNase残留	无检出	10 U酶与HEK-293 RNA 37°C孵育1小时
宿主DNA残留	< 10拷贝/10 U	荧光定量PCR法
宿主蛋白残留	< 50 ppm	中国药典2020版第四部菌体蛋白残留量测定法（通则3412）
细菌内毒素含量	< 10 EU/mg	中国药典2020版第四部凝胶限度实验法（通则1143）

建议反应体系

组分	用量	终浓度
10 × Capping Buffer	2 µl	1 ×
Vaccinia Capping Enzyme (10 U/µl)	1 µl	0.5 U/µl
GTP (10 mM)	1 µl	0.5 mM
SAM (2 mM)	1 µl	0.1 mM
Denatured RNA	10 µg	500 ng/µl
RNase-free ddH_2O	Up to 20 µl	-

反应条件：37°C 30min

注意事项

1. 本加帽反应效率受RNA 5'端结构影响，因此建议通过热变性（65°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. 本加帽反应一般可以在30 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60 min。
3. SAM在pH 7 - 8，37°C条件下不稳定，需要在反应开始前新鲜配置。为避免SAM降解，该工作液需要保存于冰上。
4. 反应体系中可添加RNA酶抑制剂（Vazyme #DD4102）防止RNase污染，建议使用浓度1 - 2 U/µl。
5. 经本制品Cap0加帽的RNA可以通过2'氧甲基转移酶（Vazyme #DD4110）甲基化形成Cap1 RNA。二步加帽反应也可同时进行，反应体系参考DD4110说明书。
6. 经本制品Cap0加帽的RNA可以通过Poly（A）聚合酶（Vazyme #DD4111）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。

*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。