

mRNA Capping Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号: LC101

保存: -20°C保存一年, 避免反复冻融。

产品说明

本产品包含牛痘病毒加帽酶、mRNA帽结构2'-O-甲基转移酶和其他加帽反应组分, 可用于对T7体外转录(JT101)产生的RNA进行5'加帽修饰。

真核生物中, 转录形成原始mRNA后需要在5'端形成一个特殊的帽子结构, 此结构对于mRNA的稳定、转运(出核)、翻译过程均有重要作用。通过加帽酶的酶促反应对RNA的5'端进行加帽修饰是一种简单有效的方法: 牛痘病毒加帽酶 (Vaccinia Capping Enzyme)能够将7-甲基鸟苷酸帽子 (m7Gppp, Cap0)连接至RNA 5'端, 形成m7Gppp5'-mRNA (Cap0-mRNA); mRNA帽结构2'-O-甲基转移酶 (mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase)以Cap0-mRNA为底物, 以SAM (S-腺苷甲硫氨酸)作为甲基供体将Cap0-mRNA 5'端紧邻帽结构的第一个核苷酸的2'-OH甲基化, 形成Cap1-mRNA。

Cap1结构能够提高mRNA稳定性, 有助于增强其细胞转染和显微注射实验中的表达能力。

本产品通过在加帽反应中同时使用牛痘病毒加帽酶和mRNA Cap-2'-O-甲基转移酶, 使得加帽反应可以在同一体系中完成, 反应产物为Cap1-mRNA, 加帽效率可接近100%, 并且帽子结构方向正确。

mRNA加帽反应原理

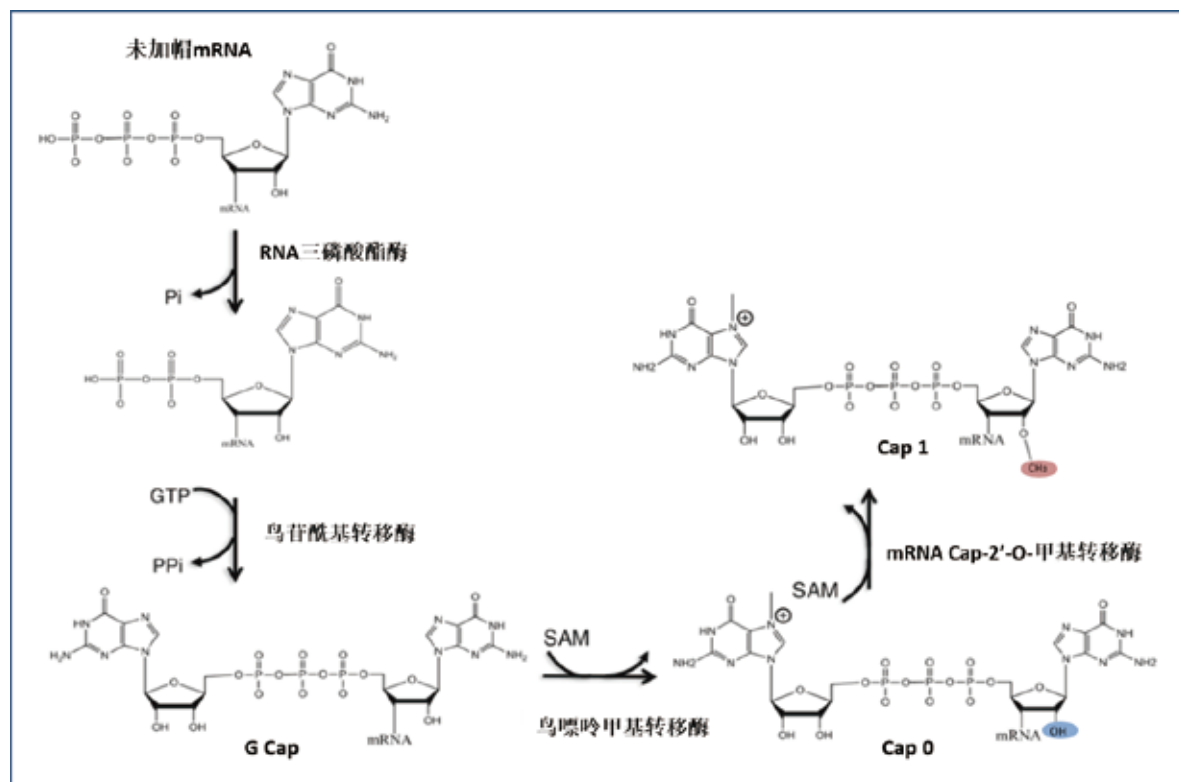


图1. 牛痘病毒加帽酶及mRNA Cap-2'-O-甲基转移酶参与的mRNA加帽反应途径。图片修改自Michael Beverly, Amy Dell, et.al., Label-free Analysis of mRNA Capping Efficiency Using RNaseH Probes And LC-MS. Anal Bioanal Chem (2016).



试剂盒组成 (20 μ l反应体系)

产品组分	LC101-01 (25 rxns)	LC101-02 (100 rxns)
Vaccinia Capping Enzyme	20 μ l	80 μ l
mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase	40 μ l	160 μ l
10 \times Capping Reaction Buffer	50 μ l	200 μ l
GTP (10 mM)	50 μ l	200 μ l
SAM (32 mM)	10 μ l	40 μ l
Ribonuclease Inhibitor	10 μ l	40 μ l
RNase-free Water	1 ml	2 \times 1 ml

酶储缓冲液

• 20 mM Tris-HCl (pH 8.0, 25 $^{\circ}$ C), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% (v/v) Triton X-100, 50% (v/v) Glycerol.

酶活定义

- **Vaccinia Capping Enzyme**: 在37 $^{\circ}$ C条件下, 1小时内将10 pmol GTP掺入到80 nt转录产物上所需的酶量定义为1个活性单位 (Unit);
- **mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase**: 在37 $^{\circ}$ C条件下, 1小时内甲基化10 pmol的80 nt带帽RNA转录产物所需的酶量定义为一个酶活单位(Unit)。

操作流程(本步骤用于20 μ l反应体系对 \leq 10 μ g RNA进行加帽修饰, 可根据实验需要按比例放大体系)

实验前准备: SAM试剂在pH 7~8、37 $^{\circ}$ C条件下稳定性较差, **需现用现配**: 提前计算好反应需要的SAM体积, 在反应前将32 mM储存液用RNase-free Water稀释为20 mM工作液, 工作液需始终置于冰上以防止SAM降解;

- (1) 取10 μ g RNA至PCR管, 用RNase-free Water稀释至所需体积 (详见下表反应体系);
- (2) 65 $^{\circ}$ C加热10分钟 (若RNA的5'端结构复杂, 可延长至60分钟), 取出置于冰上5分钟, 完成RNA变性;
- (3) 在PCR管中按照下表配制加帽反应体系:

反应组分	体积	工作浓度
变性RNA	\leq 10 μ g	-
10 \times Capping Reaction Buffer	2 μ l	1 \times
GTP (10 mM)	2 μ l	1 mM
SAM (20 mM)	0.5 μ l	500 μ M
Ribonuclease Inhibitor	0.4 μ l	-
Vaccinia Capping Enzyme	0.8 μ l	-
mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase	1.6 μ l	-
RNase-free Water	to 20 μ l	-
Total Volume	20 μ l	-

- (4) 37 $^{\circ}$ C孵育1小时(对于 < 200 nt的RNA加帽可将时间延长至2小时);
- (5) 此时mRNA已经加帽完成, 理论上产物均为Cap1-mRNA, 可用于下游应用。若加帽完成的RNA需要进行加尾处理, 推荐使用全式金mRNA Poly(A) Tailing Kit (货号: LA201)进行3'加尾。完成加帽加尾的mRNA需经过纯化才能用于转染。

注意事项

- 避免RNase污染: 请务必使用RNase-free的水、移液枪头(带滤芯)和离心管, 操作过程穿戴实验服和手套;
- 用于加帽反应的RNA需经过纯化处理并溶解在无RNase的水中, 所有溶液不能含有EDTA和盐离子;
- 反应前65 $^{\circ}$ C热处理RNA使其变性以去除转录产物5'端二级结构, 若已知RNA的5'端结构复杂, 可适当延长加热时间至60分钟以提高加帽效率;



- SAM试剂在pH 7~8、37°C条件下稳定性较差，需现用现配：提前计算好反应需要的SAM体积，在反应前将32 mM储存液用RNase-free Water稀释为20 mM工作液，工作液需始终置于冰上以防止SAM降解；
- 反应体系可根据实验需要进行平行放大或缩小，例如，100 μl反应体系可用于对50 μg以上体外转录的mRNA进行加帽，反应体系如下：

反应组分	体积	工作浓度
变性RNA	≤50 μg	-
10×Capping Reaction Buffer	10 μl	1×
GTP (10 mM)	10 μl	1 mM
SAM (20 mM)	2.5 μl	500 μM
Ribonuclease Inhibitor	2 μl	-
Vaccinia Capping Enzyme	4 μl	-
mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase	8 μl	-
RNase-free Water	to 100 μl	-
Total Volume	100 μl	-

应用实例

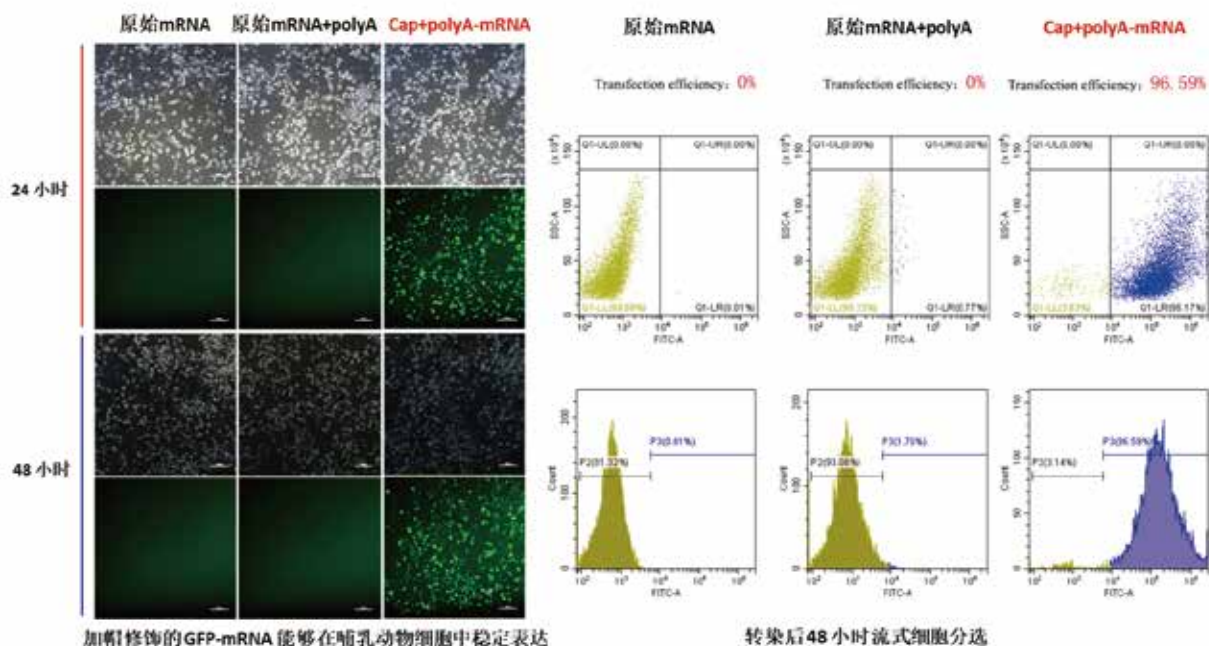


图2. 利用本产品进行加帽修饰的GFP-mRNA转染细胞后可以稳定高效表达



质量控制

项目	标准	方法
来源	重组大肠杆菌	
产品外观	透明澄清	目视检查
活性	标示值	加帽效率测定法
纯度	≥95%	SDS-PAGE或SEC-HPLC
核酸内切酶残留	未检出	10 U牛痘病毒加帽酶/50 U 2'-O-甲基转移酶与1 μg λDNA在37°C孵育16小时，DNA电泳谱带不发生变化
核酸外切酶残留	未检出	10 U牛痘病毒加帽酶/50 U 2'-O-甲基转移酶与1 μg λ-Hind III digest DNA在37°C孵育16小时，DNA电泳谱带不发生变化
切口酶活性	未检出	10 U牛痘病毒加帽酶/50 U 2'-O-甲基转移酶与1 μg pBR322质粒在37°C孵育16小时，DNA电泳谱带不发生变化
RNase残留	未检出	10 U牛痘病毒加帽酶/50 U 2'-O-甲基转移酶与1.6 μg MS2 RNA在37°C孵育4小时，RNA电泳谱带不发生变化
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 (通则1143)
大肠杆菌DNA残留	≤1拷贝/U	荧光定量PCR法
支原体检测	阴性	支原体检测试剂盒

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1-202202

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

