

Vaccinia Capping System

产品简介

真核生物中 mRNA 经转录后修饰可在 5'端形成一个特殊结构，即帽子结构，该结构对 mRNA 的稳定、转运与翻译过程均有较重要作用。牛痘病毒加帽酶是催化形成帽子结构的有效酶，其由 D1 和 D12 两个亚基组成，兼具 RNA 三磷酸酯酶活性 (TPase)、鸟苷酰基转移酶活性 (GTase) 和鸟嘌呤甲基转移酶活性 (N7 MTase)。牛痘病毒加帽酶参与作用下的 mRNA 加帽过程如下图 1 所示，在 mRNA 5'端添加一个 7-甲基鸟嘌呤帽结构 (m7Gppp)，即为 Cap0 (图 2)。

mRNA+1 位核苷酸的核糖 2' 位羟基也可以甲基化，产物称为 Cap1，人类的 mRNA 都具有 Cap1 结构。Cap1 不仅与翻译起始有关，在针对外源 RNA 的先天免疫系统中，还可作为自身 RNA 的标志。2-O-甲基转移酶可以在 mRNA+1 位核苷酸的 2'-OH 位置处添加一个甲基基团，最终形成最有 Cap1 结构的 mRNA (图 3)。

该产品主要应用于 RNA 体外转录之后加帽，形成具有 Cap1 帽子结构的 mRNA。

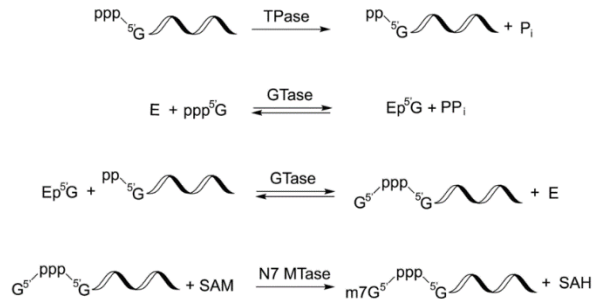


图 1 Cap0 的形成过程

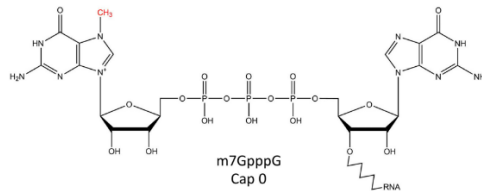


图 2 带有 Cap0 结构的 mRNA

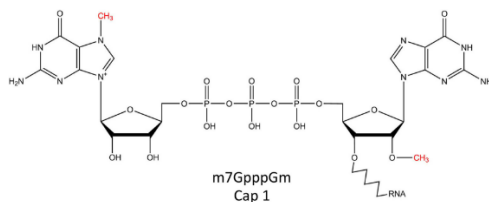


图 3 带有 Cap1 结构的 mRNA

产品信息

货号	17121ES50 / 17121ES60 / 17121ES70
规格	50 T / 100 T / 500 T

组分信息

组分编号	组分名称	17121ES50	17121ES60	17121ES70
17121-A	10×Capping Buffer	100μL	200μL	1000μL
17121-B	Vaccinia Capping Enzyme(10U/μl)	50μL	100μL	500μL
17121-C	2-O-methyltransferase(50U/μl)	50μL	100μL	500μL
17121-D	RNase inhibitor(40U/μl)	25μL	50μL	250μL
17121-E	SAM (32mM)	12.5μL	25μL	125μL
17121-F	GTP (10mM)	50μL	100μL	500μL
17121-G	DEPC-H ₂ O	2500μL	5000μL	25ml

用户需自备材料：转录后的 RNA、RNA 纯化试剂。

备注：RNA 可使用翌圣生物 10623ES (T7 High Yield RNA Synthesis Kit) 进行合成。

储存条件

-25~-15°C保存，有效期 1 年。

使用说明

酶法加帽反应（以 20μl 反应体系为例）：

- 1) 取 10μg RNA 用 DEPC-H₂O 稀释至 14 μL；
- 2) 将 RNA 置于 65°C加热 5min，而后立即置于冰上 5min；
- 3) 依次加入以下各组分：

组分	体积 (μL)	终浓度
Denatured RNA	10μg	0.5μg/μl
10×Capping Buffer	2	1×
GTP(10mM)	1	0.5mM
SAM(32mM)	0.5	0.8mM
RNase inhibitor(40U/μl)	0.5	1U/μl
Vaccinia Capping Enzyme(10U/μl)	1	0.5U/μl
2-O-methyltransferase(50U/μl)	1	2.5U/μl

37°C反应 30min。

注意事项

- 1、加帽效率受 RNA 5' 端序列及结构影响，因此建议在加帽反应前，通过热变性的方法打开 RNA 的二级结构使 RNA 更容易加帽。一般热变性的操作条件为 65°C、5min 后立即置于冰浴，但可根据 5' 端序列、结构的复杂程度以及加帽体积适当延长热变性时间；
- 2、本试剂盒中 SAM 浓度为 32mM，如加样体积过小，可在加帽反应前根据使用量将 32mM 储液用 DEPC-H₂O 稀释成 8mM 或更低浓度的工作液；因 SAM 不稳定，稀释过程需在冰上操作，稀释量应等同于使用量；不建议将储液一次性稀释成低浓度的工作液；

- 3、 如仅需要制备具有 Cap0 帽子结构的 RNA，反应体系中可不添加 2-O-methyltransferase；
- 4、 加帽反应一般可在 30min 之内完成，可根据 RNA 5' 端序列、长度以及反应体积等调整时长。
- 5、 本产品仅作科研用途。
- 6、 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。

相关产品

产品名称	货号
T7 High Yield RNA Synthesis Kit	10623ES
Deoxyribonuclease I (DNase I) GMP-grade (2 U/ μ L)	10611ES
Hieff NGS [®] RNA Cleaner	12602ES
Hieff NGS [®] mRNA Isolation Master Kit mRNA 纯化试剂盒	12603ES
T7 High Yield RNA Synthesis Kit for Co-transcription	10673ES