

Vaccinia Capping Enzyme

Code No. 2460A 包装量: 500 U
浓度: 10 U/μl

附带试剂:

10X Capping Buffer 100 μl
S-adenosylmethionine (SAM) (32 mM) 100 μl
GTP (10 mM) 50 μl

制品说明:

在真核生物中,帽结构对于mRNA的稳定、出核转运以及翻译起到重要作用。Vaccinia Capping Enzyme是一种来源于牛痘病毒的加帽酶,在RNA的5'末端(5'-三磷酸RNA)加上7-甲基鸟苷酸结构(Cap 0)。本酶由D1和D2两个亚基组成,具有RNA三磷酸酶、鸟苷酸转移酶和鸟嘌呤甲基转移酶这三种酶活性。该酶与本产品中包含的试剂一起使用(10X Capping Buffer, S-adenosylmethionine (SAM), GTP),可以在体外高效合成mRNA的完整Cap-0结构。此外,本酶也可以与mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase (Code No. 2470A/B)一起使用,一步反应高效地在RNA 5'末端紧邻帽结构(Cap 0)的第一个核苷酸的2'-O上添加甲基基团,形成带有Cap-1结构的mRNA。

保存: -20°C

来源:

Escherichia coli carrying plasmids containing the genes for vaccinia virus capping enzyme

性质:

分子量: 约98 kDa和33 kDa (异二聚体)

活性定义:

在37°C下1小时内将10 pmol的[α-32P]GTP结合到RNA转录物中所需的酶量定义为1个活性单位(U)。

活性测定反应液组成:

| | |
|--------------|----------------|
| 1X | Capping Buffer |
| 1 μM | GTP |
| 10 μCi/ml | [α-32P] GTP |
| 0.67 mM | SAM |
| 2.5 μg/50 μl | 100 nt RNA |

质量控制:

请查阅各批次的Certificates of Analysis(CoA)。产品CoA请在Takara Bio Inc.网站中下载:

https://catalog.takara-bio.co.jp/search/doc_index.php

用途:

1. Cap-0 mRNA的制备
2. 标记5'末端mRNA

使用注意:

1. 混匀时,不要剧烈振荡;
2. 如果试剂、试管或微量移液器吸头被RNase污染,就会导致RNA产量减少或降解。在实验过程中应采取预防措施以避免RNase污染,如戴一次性手套以及使用专用于RNA实验的试管及微量移液器吸头。

操作流程:

1. 将未加帽的RNA(5'-三磷酸RNA)制备成带有Cap-0的RNA。

| | |
|--|---------------------|
| Denatured RNA transcript (10 μg) ^{*1,4} | 15 μl |
| 10X Capping Buffer | 2 μl |
| GTP (10 mM) | 1 μl |
| SAM (2 mM, dilute 32 mM stock to 2 mM) ^{*2} | 1 μl |
| Vaccinia Capping Enzyme (10 U/μl) | 1 μl |
| Total | 20 μl ^{*3} |

在37°C孵育30分钟^{*4}。

2. 将未加帽的RNA(5'-三磷酸RNA)制备成带有Cap-1的RNA。

| | |
|--|---------------------|
| Denatured RNA transcript (10 μg) ^{*1,4} | 14 μl |
| 10X Capping Buffer | 2 μl |
| GTP (10 mM) | 1 μl |
| SAM (4 mM, dilute 32 mM stock to 4 mM) ^{*2} | 1 μl |
| Vaccinia Capping Enzyme (10 U/μl) | 1 μl |
| mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase (50 U/μl) | 1 μl |
| Total | 20 μl ^{*3} |

在37°C下孵育1小时^{*4}。

- *1 为了去除转录产物5'端的二级结构,在反应前热变性RNA(5'-三磷酸RNA)。
- (1) 取10 μg RNA,用RNase-free water将体积调至15 μl(制备Cap-0 RNA)或14 μl(制备Cap-1 RNA)。
 - (2) 在65°C下热变性5-10分钟,然后立即在冰上放置5分钟。
- *2 SAM不稳定。在反应前,使用RNase-free water将32 mM原液进行必要量的稀释,稀释液使用前冰上放置。
- *3 可根据实验需要放大反应体系。
- *4 如果RNA长度小于200 nt,延长孵育时间以提高加帽效率(和甲基化效率)(Cap-0 RNA制备:30分钟→1小时,Cap-1 RNA制备:1小时→2小时)。

注:RNase抑制剂可用于增强反应过程中RNA的稳定性。如有必要,请以1 U/μl的终浓度添加。

参考文献:

- 1) Shuman S. *J Biol Chem.* (1990) **265**: 11960-11966.
- 2) Furuichi Y, LaFiandra A, and Shatkin A J. *Nature.* (1977) **266**: 235-239.
- 3) Lewis J D and Izaurralde E. *Eur J Biochem.* (1997) **247**: 461-469.
- 4) Ramanathan A, Bobb G B, and Chan S H. *Nucleic Acids Res.* (2016) **44**: 7511-7526.

关联产品:

Takara IVTpro™ mRNA Synthesis System (Code No. 6141)
Cloning Kit for mRNA Template (Code No. 6143)
Takara IVTpro™ T7 mRNA Synthesis Kit (Code No. 6144)
T7 RNA Polymerase ver.2.0 (Code No. 2541A)
mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase (Code No. 2470A/B)
Recombinant RNase Inhibitor (Code No. 2313A/B)
RNase-free Water (Code No. 9012)
NucleoSpin RNA Clean-up (Code No. 740948.10/.50/.250)

IVTpro is a trademark of Takara Bio Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用,不能用于人、动物的医疗或诊断程序,不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准,不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品,或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。如果您需要其他用途的许可授权,请联系我们,或访问我们网站 www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

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。

本文件由宝日生物技术(北京)有限公司翻译制作,最新版本文件请参考Takara Bio Inc.网站。为正确使用Takara产品,您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

v202209Da