

Vaccinia Capping Enzyme

牛痘病毒加帽酶

产品信息

产品名称	产品编号	规格
	10615ES76	500 U
Vaccinia Capping Enzyme 牛痘病毒加帽酶	10615ES84	2000 U
	10615ES92	10000 U

产品描述

真核生物中 mRNA 经转录后修饰在 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、鸟苷酰基转移酶活性和鸟嘌呤甲基转移酶活性，可将 7-甲基鸟嘌呤帽结构 (m⁷Gppp) 连接到 RNA 的 5'末端 (m⁷Gppp5'N)。牛痘病毒加帽酶，在合适浓度的加帽缓冲液 (Capping buffer)，鸟苷三磷酸 (GTP)，S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 等存在条件下，能够在一个小时之内对 RNA 进行加帽，并且保证正确的方向。

本品以无菌液体形式提供，可应用于体内/体外翻译前 mRNA 的加帽反应或 mRNA 的 5'末端标记反应。

产品性质

来源 (Source)	携带牛痘病毒加帽酶基因的 <i>E. coli</i>
最适温度 (Optimum Temperature)	37°C
储存缓冲液 (Storage Buffer)	20mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 50%甘油
活性单位定义 (Unit Definition)	37°C条件下, 1 小时内将 10 pmol GTP (α - ³² P) 掺入到一条含 80 个核苷酸 (80nt) 转录产物上所需要的酶量, 即为 1 个单位。

产品组分

组分编号	组分名称	产品编号/规格		
		10615ES76 (500 U)	10615ES84 (2000 U)	10615ES92 (10000 U)
10615-A	10×Capping Buffer	150 μ L	500 μ L	1.25 mL×2
10615-B	Vaccinia Capping Enzyme (10 U/ μ L)	50 μ L	200 μ L	1 mL

运输和保存方法

干冰运输。-15°C ~ -25°C 保存，有效期一年。推荐分装保存，避免反复冻融。

使用方法

加帽反应 (反应体系 20 μ L)

本步骤适用于 10 μ g RNA (\geq 100 nt) 的加帽反应，且可根据实验需要放大。

1. 取 10 μ g RNA 至 1.5 mL 离心管，使用无核酸酶的水稀释至 9.5 μ L；
2. 65°C 加热 5 min；
3. 取出离心管置于冰上 5 min；

4. 依次加入以下组分:

组分	体积
Denatured RNA	9.5 μ L
10 \times Capping Buffer	2.0 μ L
Murine RNase inhibitor(40 U/ μ L)	0.5 μ L
GTP (10 mM)	1.0 μ L
SAM (10 mM, fresh)	1.0 μ L
Vaccinia Capping Enzyme (10 U/ μ L)	5.0 μ L
Cap 2'-O-Methyltransferase (50 U/ μ L)	1.0 μ L

【注】: 10 \times Capping Buffer(Cat# 10666): 0.5 M Tris-HCl, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT pH 8.0 @ 25 $^{\circ}$ C。

5. 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h;

6. RNA 加帽完成, 可进行后续实验。

注意事项

1. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作;
2. 所提取的 RNA 需经过纯化并使用无核酸酶的水重悬;
3. 在加入酶之前需要对 RNA 溶液进行加热以去除 5'末端的二级结构;
4. 对于已知 5'末端结构的 RNA, 可以延长反应时间至 4 h, 提高加帽效率;
5. 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。