

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°C。

5. 37°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。