

Faustovirus Capping Enzyme

产品编号	产品名称	包装
R7051S	Faustovirus Capping Enzyme	500U
R7051M	Faustovirus Capping Enzyme	2500U

产品简介:

- 碧云天研发生产的Faustovirus Capping Enzyme (FCE), 即Faustovirus加帽酶, 是由碧云天自主研发的PerfectProtein™技术平台表达、纯化获得的一种来自Faustovirus S17菌株的单亚基mRNA加帽酶。FCE具有给mRNA添加Cap-0帽结构所需的三种酶活性, 即三磷酸酶(Triphosphatase, TPase)、鸟嘌呤转移酶(Guanylyltransferase, GTase)和(鸟嘌呤-N7)-甲基转移酶((Guanine-N7)-Methyltransferase, N7 MTase)的活性, 它可在真核生物mRNA的5'末端的三磷酸和二磷酸位置催化加入N⁷-甲基鸟苷帽结构(m⁷GpppNp), 从而产生带有Cap-0帽结构的mRNA [1]。
- 与牛痘病毒加帽酶(Vaccinia capping enzyme, VCE)相比, FCE具有更宽的反应温度范围和更高的酶活性, 且在37°C和高至55°C的温度下都能够具备加帽活性。FCE与mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase (R7053)协同作用, 可一步添加Cap-1帽结构至mRNA。真核生物mRNA Cap-0和Cap-1帽结构的添加以及poly (A)加尾对于其成熟至关重要, 其中Cap-0帽结构可以通过保护mRNA免遭5'→3'核糖核酸外切酶降解以增加mRNA稳定性[2], 还可防止三磷酸化的mRNA激活机体的天然免疫反应[3]。
- 本产品对mRNA添加Cap-0帽结构的原理请参考图1。

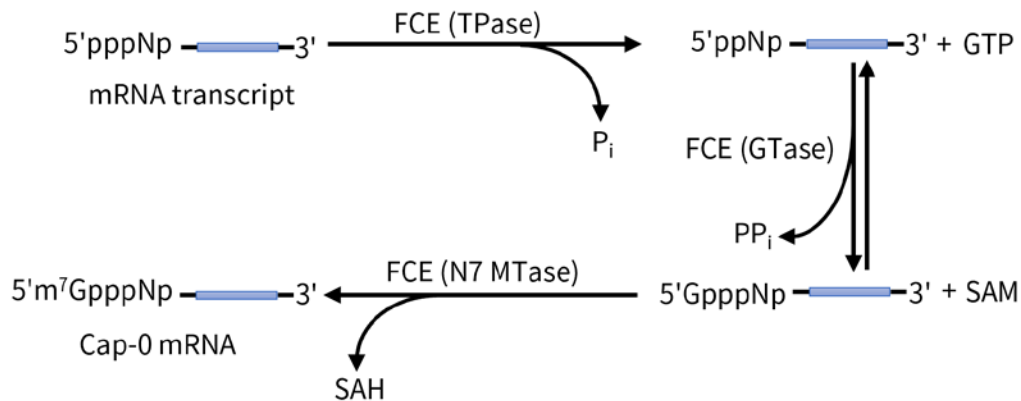


图1. 碧云天Faustovirus Capping Enzyme (R7051)对mRNA添加Cap-0帽结构的原理图。首先, FCE通过其RNA三磷酸酶活性将mRNA 5'-三磷酸(5'pppN-)裂解为二磷酸(5'ppN-); 然后, FCE通过其RNA鸟苷酸转移酶活性将GTP连接到mRNA N1的5'-二磷酸形成未甲基化的G帽结构(5'GpppN-); 最后, FCE通过其鸟嘌呤7-甲基转移酶活性, 以S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)作为甲基供体, 催化G帽的N7位置的甲基化, 最终产生带有Cap-0帽结构的mRNA。

- 碧云天Faustovirus Capping Enzyme (R7051)对EGFP mRNA加帽后的细胞转染效果请参考图2。

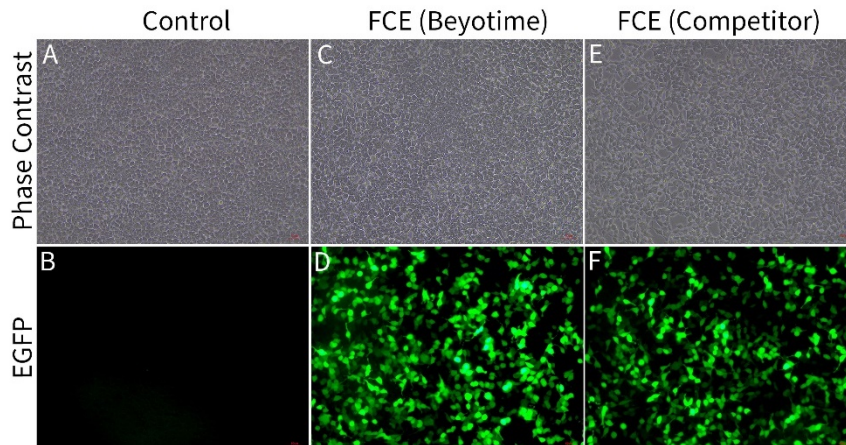


图2. 碧云天Faustovirus Capping Enzyme (R7051)和N公司的同类产品(Competitor)催化EGFP mRNA的5'末端形成Cap-0帽结构, 然后将该mRNA转染293T细胞表达EGFP蛋白的效果图。在25μl反应体系(50mM Tris-HCl (pH8.0 @ 25°C), 5mM KCl,

1mM MgCl₂, 1mM DTT, 0.02% Poloxamer 188, 5µg EGFP mRNA, 0.8U/µl RNase Inhibitor (R0101/R0102/ R0105/R0106), 0.5mM GTP (100mM, Nuclease free) (D7380), 0.1mM SAM)中分别加入25U的本产品或N公司(Competitor)的FCE, 37°C孵育60分钟反应生成Cap-0帽结构, 70°C孵育10分钟以终止反应。25万个293T (人胚肾细胞) (C6008)在BeyoGold™ 24孔细胞培养板(FCP243)中培养24小时, 每孔使用Lipo8000™转染试剂(C0533)转染500ng未添加或添加Cap-0帽结构的EGFP mRNA, 继续培养24小时后使用荧光显微镜进行拍照。如图所示, 本产品与N公司的产品相比, 具有类似的催化效果。A和B分别为不加帽EGFP mRNA转染后的明场图片和荧光图片; C和D分别为使用本产品添加Cap-0帽结构的EGFP mRNA转染后的明场图片和荧光图片; E和F分别为使用N公司的Faustovirus Capping Enzyme添加Cap-0帽结构的EGFP mRNA转染后的明场图片和荧光图片。EGFP mRNA的制备方法: 首先以带有T7 Promoter的EGFP完整编码序列的线性化质粒DNA为模板, 使用T7 RNA Polymerase (D7069/R7012/R7013)和ATP (100mM, Nuclease free) (D7378)、CTP (100mM, Nuclease free) (D7379)、GTP (100mM, Nuclease free) (D7380)以及UTP (100mM, Nuclease free) (D7381), 或T7 High Yield RNA Transcription Kit (R7018), 或T7 Quick High Yield RNA Transcription Kit (R7016)转录获得EGFP mRNA。实际检测效果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中效果仅供参考。

- **用途:** 体内或体外翻译前mRNA的加帽; mRNA的5'末端标记。
- **来源:** 由大肠杆菌表达Faustovirus Capping Enzyme基因, 经纯化而获得。
- **活性单位定义:** One unit of Faustovirus Capping Enzyme is defined as the amount of enzyme required to convert 75pmol of a 20-mer transcript to Cap-0 RNA in 30 minutes at 37°C.
- **纯度:** 不含DNA内切酶和外切酶, 不含RNA酶, 不含磷酸酯酶。
- **酶储存溶液:** 40mM Tris-HCl (pH8.0 @ 25°C), 100mM NaCl, 50mM Arginine, 0.1mM TCEP, 50% Glycerol.
- **Capping Buffer (10X):** 500mM Tris-HCl (pH8.0 @ 25°C), 50mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 0.2% Poloxamer 188.
- **失活或抑制:** 70°C加热10分钟可使Faustovirus Capping Enzyme失活。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
R7051S-1	Faustovirus Capping Enzyme (25U/µl)	20µl
R7051S-2	Capping Buffer (10X)	100µl
R7051S-3	GTP (10mM)	30µl
R7051S-4	SAM (32mM)	10µl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
R7051M-1	Faustovirus Capping Enzyme (25U/µl)	100µl
R7051M-2	Capping Buffer (10X)	500µl
R7051M-3	GTP (10mM)	150µl
R7051M-4	SAM (32mM)	50µl
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存, 至少两年有效。

注意事项:

- 本产品使用时宜放在冰盒内或冰浴上, 使用完毕后宜立即放置于-20°C保存。
- 由于涉及RNA操作, 须严格按照RNA操作的规范进行, 避免RNase污染。
- 实验中用到的吸头、离心管等实验耗材必须为RNase free的或须经DEPC处理, 推荐选购碧云天的BeyoGold™系列中无RNase和DNase污染的耗材产品。不含RNase的超纯水推荐使用碧云天的BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile) (ST876)或DEPC水(DNase、RNase free) (R0021/R0022)。
- 桌面等环境以及仪器设备表面的RNase、DNase、RNA和DNA的去除推荐使用碧云天的RNase, DNase, RNA and DNA Away (R0127)进行快速处理。
- 可根据具体应用选择合适的操作方法, 可能需准备额外的试剂, 如RNase Inhibitor、超纯水等。
- SAM在pH值为7-8, 37°C条件下不稳定, 建议在反应开始前根据实际反应数配制新鲜的工作液并放置于冰上, 防止SAM降解。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. FCE对mRNA添加Cap-0帽结构。

- a. DNA模板的制备。带有T7 Promoter或其它适当启动子的线性化质粒DNA、PCR产物或合成的DNA片段等均可以作为体外转录的模板。

- b. mRNA的制备。使用T7 RNA Polymerase (D7069/R7012/R7013)和ATP (100mM, Nuclease free) (D7378)、CTP (100mM, Nuclease free) (D7379)、GTP (100mM, Nuclease free) (D7380)及UTP (100mM, Nuclease free) (D7381), 或T7 High Yield RNA Transcription Kit (R7018), 或T7 Quick High Yield RNA Transcription Kit (R7016)或其它启动子对应的酶或试剂盒转录获得mRNA。
- c. SAM (2mM)的配制。在反应开始前根据实际反应数配制新鲜SAM工作液。将SAM (32mM)分装并用BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile) (ST876)稀释至2mM, 放置于冰上备用。
- d. 对mRNA添加Cap-0帽结构的反应体系的设置。请参考下表在冰浴中配制如下反应体系。

Reagent	Volume	Final Concentration
Ultrapure Water	(37-x) μ l	-
mRNA	x μ l	Up to 1 μ g/ μ l
65°C for 5min, then immediately incubate in ice-bath 0.04mM		
RNase Inhibitor (40U/ μ l)	1 μ l	0.8U/ μ l
Capping Buffer (10X)	5 μ l	1X
GTP (10mM)	2.5 μ l	0.5mM
SAM (2mM)	2.5 μ l	0.1mM
Faustovirus Capping Enzyme (25U/ μ l)	2 μ l	1U/ μ l
Total Volume	50μl	-

注1: 如果只进行一个反应, 请把除Faustovirus Capping Enzyme以外的组分充分混匀后, 再加入Faustovirus Capping Enzyme; 如果同时进行多个反应, 可以把上表中除mRNA之外的所有溶液和酶提前预混合后分装到各反应管内, 再加入65°C变性5分钟后立即置于冰浴中的mRNA, 轻轻混匀(可以用移液器吹打混匀, 或用Vortex在最低速度轻轻混匀)后低速离心沉淀液体。

注2: 本反应体系中涉及RNA, 可以酌情适量添加RNase Inhibitor, Murine (R0101)、RNase Inhibitor (R0102)、RNase Inhibitor Plus, Human Placenta (R0105)或RNase Inhibitor, Human Placenta (R0106)。

注3: 在与FCE温育前, 将mRNA溶液在65°C加热5分钟以打开转录产物5'末端的二级结构。对于5'末端高度结构化的转录产物, 可将时间延长至10分钟或适当提高变性温度。

注4: SAM在pH值为7-8, 37°C条件下不稳定, 建议在反应开始前再配制新鲜的工作液并将其放置于冰上, 防止SAM降解。

注5: 对于5'末端结构化的转录产物, 可将反应时间适当延长以提高加帽效率。

注6: 标记5'末端时, GTP总浓度应为反应中mRNA摩尔浓度的1-3倍。可以将10mM GTP酌情稀释并掺入一定量的经荧光探针、生物素等标记的GTP以制成GTP混合物。

注7: FCE也可与mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase (R7053)协同作用, 可一步添加Cap-1帽结构至mRNA。

- e. 反应条件: 37°C孵育60分钟。对于长度小于200nt的RNA, 宜将孵育时间延长至2小时或减少底物的用量。
- f. 终止反应: 70°C加热10分钟可使Faustovirus Capping Enzyme失活。
- g. 反应后可通过质谱(Mass spectrometry, MS)分析或者细胞转染(Transfection)进一步检测加帽效率。

2. 其它应用请参考相关文献资料进行。

参考文献:

1. Ramanathan A, Robb GB, Chan SH. Nucleic Acids Res. 2016. 44(16):7511-26.
2. Furuichi Y, LaFiandra A, Shatkin AJ. Nature. 1977. 266(5599):235-9.
3. Schlee M, Hartmann G. Nat Rev Immunol. 2016. 16(9):566-80.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D2308-10 μ g	pT3/SP6/T7-RNA Linearized Template (RNA体外转录质粒)	10 μ g
D2310	pT3/SP6/T7-RNA-Template (RNA体外转录质粒)	1 μ g/100 μ g
D2312	pRNA-T3-T7 (RNA体外转录质粒)	1 μ g/100 μ g
D2314	pRNA-SP6-T7 (RNA体外转录质粒)	1 μ g/100 μ g
D6128	BsaI	1kU/5kU/20kU/200kU
D7383-1ml	NTP set (100mM each, Nuclease free)	250 μ l \times 4
D7385	NTP Mix (10mM each, Nuclease free)	500 μ l/2ml
D7387	NTP Mix (25mM each, Nuclease free)	250 μ l/1ml
R0021/R0022	DEPC水(DNase、RNase free)	100ml/500ml
R0081	BeyoMag™ RNA Clean Magnetic Beads (RNA纯化磁珠)	1ml/5ml/20ml/100ml
R0101	RNase Inhibitor, Murine	2kU/10kU/50kU/200kU
R0102	RNase Inhibitor	2000U/10000U/50000U

R0105	RNase Inhibitor Plus, Human Placenta	2kU/10kU/50kU/200kU
R0106	RNase Inhibitor, Human Placenta	2kU/10kU/50kU/200kU
R0107/R0108	氧钒核糖核苷复合物(RNase抑制剂)	2ml/10ml
R0123	RNase and DNase Away	250ml
R0125	RNase, DNase and DNA Away	250ml
R0127	RNase, DNase, RNA and DNA Away	250ml
R0722	Circular RNA Synthesis Kit	20次/100次
R7006	SP6 RNA Polymerase	1KU/5KU/25KU/100KU
R7009	T3 RNA Polymerase	1KU/5KU/25KU/100KU
R7012	T7 RNA Polymerase	1KU/5KU/25KU/100KU
R7016	T7 Quick High Yield RNA Transcription Kit	25次/100次
R7018	T7 High Yield RNA Transcription Kit	25次/100次
R7020	SP6 High Yield RNA Transcription Kit	25次/100次
R7025	Pyrophosphatase, Inorganic (yeast)	10U/50U/200U/1000U
R7035	RNA 5' Pyrophosphohydrolase (RppH)	200U/1kU
R7040	XRN-1	20U/100U/500U
R7051	Faustovirus Capping Enzyme	500U/2500U
R7053	mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase	2kU/10kU
R7055	One-step mRNA Capping Kit	20次/100次
R7070	<i>E.coli</i> Poly(A) Polymerase	100U/500U/2.5kU/10kU
R7075	Poly(A) Polymerase Tailing Kit	50-250次
R7090	Thermostable RNase H	250U/1000U/5000U
ST876	BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)	100ml/500ml
ST878	BeyoPure™ Ultrapure Water (Sterile, Endotoxin-Free)	100ml/500ml

Version 2024.12.24