

## One-step mRNA Capping Kit

产品编号	产品名称	包装
R7055S	One-step mRNA Capping Kit	20次
R7055M	One-step mRNA Capping Kit	100次

### 产品简介:

- 碧云天研发生产的One-step mRNA Capping Kit, 即一步法mRNA加帽试剂盒, 是一种包含Faustovirus Capping Enzyme (FCE)、mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase (mRNA 2'-O-MTase)、GTP和S-adenosylmethionine (SAM)以及加帽反应所需要的缓冲液, 可仅通过一步反应就可以添加Cap-1帽结构至mRNA的试剂盒。
- 本试剂盒对mRNA添加Cap-1帽结构的原理请参考图1。

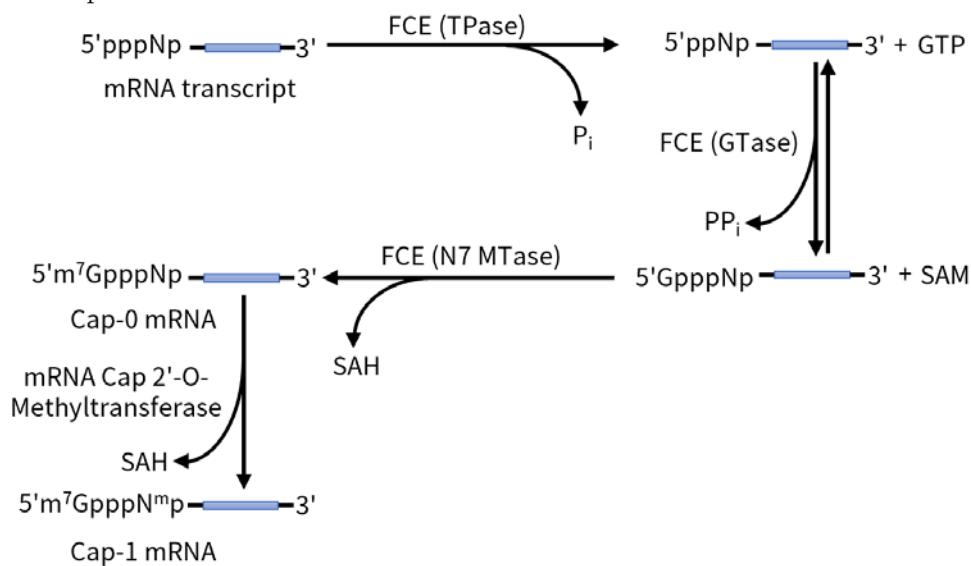


图1. 碧云天One-step mRNA Capping Kit (R7055)给mRNA添加Cap-1帽结构的原理图。首先, FCE通过其RNA三磷酸酶活性将mRNA 5'-三磷酸(5'pppN-)裂解为二磷酸(5'ppN-); 然后, FCE通过其RNA鸟苷酸转移酶活性将GTP连接到mRNA N1的5'-二磷酸形成未甲基化的G帽结构(5'GpppN-); 接着, FCE通过其鸟嘌呤7-甲基转移酶活性, 以S-腺苷甲硫氨酸作为甲基供体, 催化G帽的N7位置的甲基化, 产生带有Cap-0帽结构的mRNA; 最后, mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase以S-腺苷甲硫氨酸作为甲基供体, 催化mRNA的5'末端紧挨Cap-0帽结构的第一个核苷酸的2'-O位置添加一个甲基基团, 产生带有Cap-1帽结构的mRNA。

- 碧云天One-step mRNA Capping Kit (R7055)对EGFP mRNA加帽后的细胞转染效果请参考图2。

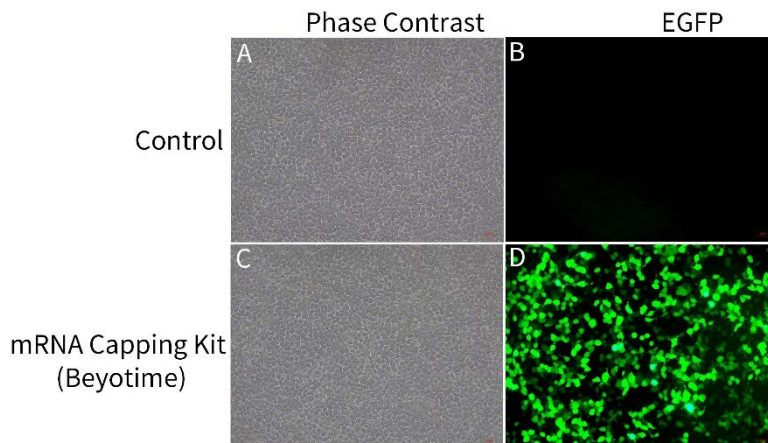


图2. 碧云天One-step mRNA Capping Kit (R7055)催化在EGFP mRNA的5'末端形成Cap-1帽结构, 然后将该mRNA转染293T细胞表达EGFP蛋白的效果图。在25 $\mu$ l反应体系(Capping Buffer (1X), 5 $\mu$ g EGFP mRNA, 0.8U/ $\mu$ l RNase Inhibitor

(R0101/R0102/R0105/R0106), 0.5mM GTP, 0.2mM SAM)中加入1 $\mu$ l Faustovirus Capping Enzyme和2 $\mu$ l mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase, 37°C孵育60分钟反应生成Cap-1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-1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, 本产品具有很好的加帽效果。A和B分别为不加帽EGFP mRNA转染后的的明场图片和荧光图片, C和D分别为使用本产品添加Cap-1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。

- Faustovirus Capping Enzyme, 即Faustovirus加帽酶, 是一种表达纯化获得的来自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N<sup>7</sup>-甲基鸟苷帽结构(m<sup>7</sup>GpppNp), 从而产生带有Cap-0帽结构的mRNA [1]。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来增加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]。
- mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase, 即mRNA Cap 2'-O甲基转移酶, 可以利用S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)作为甲基供体, 在mRNA的5'末端紧挨Cap-0帽结构(m<sup>7</sup>GpppNp)的第一个核苷酸的2'-O位置添加一个甲基基团, 产生带有Cap-1帽结构(m<sup>7</sup>GpppN<sup>m</sup>p)的mRNA。Cap-1帽结构不仅可以增强mRNA的稳定性和翻译效率, 进而提高mRNA在显微注射(Microinjection)和转染(Transfection)后的表达水平[4], 还可以帮助mRNA逃避体内某些细胞的先天免疫反应[5]。
- 用途: 体内或体外翻译前mRNA的加帽; mRNA的5'末端标记; Cap-1帽结构中的2'-O甲基化有助于mRNA逃避某些体内细胞的先天免疫反应; 提高mRNA的翻译效率; 提高mRNA在显微注射(Microinjection)和转染(Transfection)后的蛋白表达水平。
- 按照使用说明操作, 本试剂盒小包装可以进行20次加帽反应, 中包装可以进行100次加帽反应。

#### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
R7055S-1	Faustovirus Capping Enzyme	20 $\mu$ l
R7055S-2	mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase	40 $\mu$ l
R7055S-3	Capping Buffer (10X)	100 $\mu$ l
R7055S-4	RNase Inhibitor (40U/ $\mu$ l)	12 $\mu$ l
R7055S-5	GTP (10mM)	30 $\mu$ l
R7055S-6	SAM (32mM)	10 $\mu$ l
R7055S-7	Ultrapure Water	400 $\mu$ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
R7055M-1	Faustovirus Capping Enzyme	100 $\mu$ l
R7055M-2	mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase	200 $\mu$ l
R7055M-3	Capping Buffer (10X)	500 $\mu$ l
R7055M-4	RNase Inhibitor (40U/ $\mu$ l)	60 $\mu$ l
R7055M-5	GTP (10mM)	150 $\mu$ l
R7055M-6	SAM (32mM)	50 $\mu$ l
R7055M-7	Ultrapure Water	2ml
—	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. One-step mRNA Capping Kit对mRNA添加Cap-1帽结构。

- 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片段等均可作为体外转录的模板。
- 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。
- SAM (4mM)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4mM，放置于冰上备用。
- 对mRNA添加Cap-1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	(16.5-x) $\mu$ l	-
mRNA	x $\mu$ l	Up to 1 $\mu$ g/ $\mu$ l
65°C for 5min, then immediately incubate in ice-bath 0.04mM		
RNase Inhibitor (40U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	0.8U/ $\mu$ l
Capping Buffer (10X)	2.5 $\mu$ l	1X
GTP (10mM)	1.25 $\mu$ l	0.5mM
SAM (4mM)	1.25 $\mu$ l	0.2mM
Faustovirus Capping Enzyme	1 $\mu$ l	1U/ $\mu$ l
mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase	2 $\mu$ l	4U/ $\mu$ l
<b>Total Volume</b>	<b>25<math>\mu</math>l</b>	-

**注1：**如果只进行一个反应，请去除Faustovirus Capping Enzyme和mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase以外的组分充分混匀后，再加入Faustovirus Capping Enzyme和mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase；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：**在与酶温育前，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。

- 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。
  - 终止反应：70°C加热10分钟可使酶失活。
  - 加帽后可通过质谱(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：

- Ramanathan A, Robb GB, Chan SH. Nucleic Acids Res. 2016. 44(16):7511-26.
- Furuichi Y, LaFiandra A, Shatkin AJ. Nature. 1977. 266(5599):235-9.
- Schlee M, Hartmann G. Nat Rev Immunol. 2016. 16(9):566-80.
- Kuge H, Brownlee GG, Gershon PD, Richter JD. Nucleic Acids Res. 1998. 26(13):3208-14.
- Devarkar SC, Wang C, Miller MT, Ramanathan A, Jiang F, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016.113(3):596-601.

## 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
D2308-10 $\mu$ g	pT3/SP6/T7-RNA Linearized Template (RNA体外转录质粒)	10 $\mu$ g
D2310	pT3/SP6/T7-RNA-Template (RNA体外转录质粒)	1 $\mu$ g/100 $\mu$ g
D2312	pRNA-T3-T7 (RNA体外转录质粒)	1 $\mu$ g/100 $\mu$ g
D2314	pRNA-SP6-T7 (RNA体外转录质粒)	1 $\mu$ g/100 $\mu$ g
D6128	BsaI	1kU/5kU/20kU/200kU
D7383-1ml	NTP set (100mM each, Nuclease free)	250 $\mu$ l $\times$ 4

D7385	NTP Mix (10mM each, Nuclease free)	500µl/2ml
D7387	NTP Mix (25mM each, Nuclease free)	250µl/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