

## mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase

产品编号	产品名称	包装
R7053S	mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase	2kU
R7053M	mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase	10kU

### 产品简介:

- 碧云天研发生产的mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase (简称mRNA 2'-O-MTase), 即mRNA Cap 2'-O-甲基转移酶, 是由碧云天自主研发的PerfectProtein™技术平台表达、纯化获得的一种在mRNA Cap-0帽结构基础上产生Cap-1帽结构的mRNA加帽酶。mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase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[1], 还可以帮助mRNA逃避体内某些细胞的先天免疫反应[2]。
- mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase只能作用于带有N<sup>7</sup>-甲基鸟苷帽结构(m<sup>7</sup>GpppNp), 即带有Cap-0帽结构的mRNA, 不会作用于5'末端为pN、ppN、pppN或GpppN的mRNA [3]。通常可使用Faustovirus Capping Enzyme (R7051)制备带Cap-0帽结构的mRNA, 然后使用mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase添加Cap-1帽结构; 也可以与Faustovirus Capping Enzyme协同作用, 一步添加Cap-1帽结构至mRNA。
- 本产品对mRNA添加Cap-1帽结构的原理请参考图1。

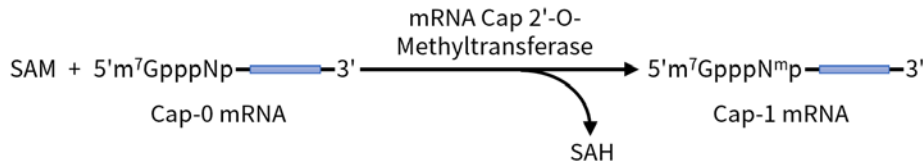


图1. 碧云天 mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase (R7053) 对 mRNA 添加 Cap-1 帽结构的原理图。mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase 以 S-腺苷甲硫氨酸(SAM) 作为甲基供体, 催化 mRNA 的 5' 末端紧挨 Cap-0 帽结构的第一个核苷酸的 2'-O 位置添加一个甲基基团, 产生带有 Cap-1 帽结构的 mRNA。

- 碧云天 mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase (R7053) 对 EGFP mRNA 加帽后的细胞转染效果请参考图2。

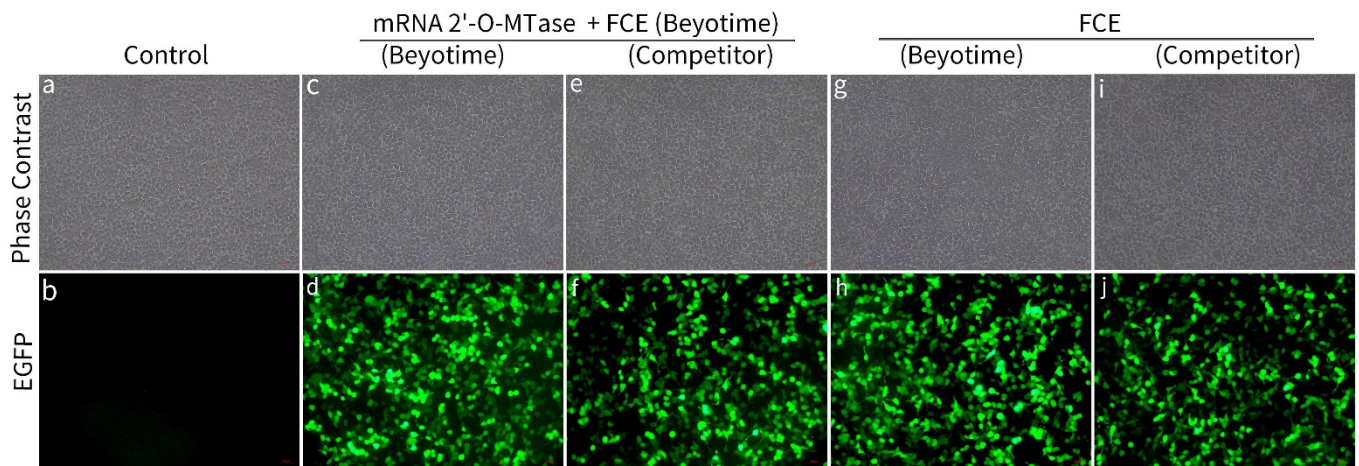


图2. 碧云天 mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase (R7053) 和 N 公司的同类产品 (Competitor) 在 EGFP mRNA 的 Cap-0 帽结构基础上产生带有 Cap-1 帽结构, 然后将该 mRNA 转染 293T 细胞表达 EGFP 蛋白的效果图。在 25 $\mu$ l 反应体系 (50mM Tris-HCl (pH8.0 @ 25°C), 5mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 0.02% Poloxamer 188, 5 $\mu$ g EGFP mRNA, 0.8U/ $\mu$ l RNase Inhibitor (R0101/R0102/ R0105/R0106), 0.5mM GTP (100mM, Nuclease free) (D7380), 0.2mM SAM) 中分别加入 25U Faustovirus Capping Enzyme (R7051), 之后加入或不加入 100U 的本产品或 N 公司 (Competitor) 的 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, 本产品与 N 公司的产品相比, 具有类似的催化效果, 与 Faustovirus Capping Enzyme 相比, 提高了 EGFP 的翻译效率。a 和 b 分别为未加帽 EGFP mRNA 转染后的明场图片和荧光图片; c 和 d 分别为使用碧云

天mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase添加Cap-1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mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase添加Cap-1帽结构的EGFP mRNA转染后的明场图片和荧光图片；g和h分别为使用碧云天的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；i和j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；Cap-1帽结构中的2'-O甲基化有助于mRNA逃避体内某些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)后的表达水平。
- **来源：**由大肠杆菌表达牛痘病毒的mRNA Cap 2'-O-甲基转移酶基因，经纯化而获得。
- **活性单位定义：**One unit of mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase is defined as the amount of enzyme required to methylate 10pmoles of 80nt long capped RNA transcript in 1 hour 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：**20mM Tris-HCl (pH8.0 @ 25°C), 100mM NaCl, 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 50% Glycerol.
- **Capping Buffer (10X)：**500mM Tris-HCl (pH8.0 @ 25°C), 50mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 0.2% Poloxamer 188.
- **失活或抑制：**70°C加热10分钟可使mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase失活。

#### 包装清单：

产品编号	产品名称	包装
R7053S-1	mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase (50U/μl)	40μl
R7053S-2	Capping Buffer (10X)	200μl
R7053S-3	SAM (32mM)	10μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
R7053M-1	mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase (50U/μl)	200μl
R7053M-2	Capping Buffer (10X)	1ml
R7053M-3	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. mRNA 2'-O-MTase对mRNA添加Cap-1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. 带Cap-0帽结构mRNA的制备。使用Faustovirus Capping Enzyme (R7051)制备带N<sup>7</sup>-甲基鸟苷帽结构(m<sup>7</sup>GpppNp, 即Cap-0帽结构)的mRNA。
- d. 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。
- e. 对带Cap-0帽结构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	(15.5-x)μl	-
mRNA (with Cap-0)	xμl	Up to 500ng/μl
65°C for 5min, then immediately incubate in ice-bath 0.04mM		
RNase Inhibitor (40U/μl)	0.5μl	1U/μl
Capping Buffer (10X)	2μl	1X
SAM (4mM)	1μl	0.2mM
mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase (50U/μl)	1μl	2.5U/μl
<b>Total Volume</b>	<b>20μl</b>	-

注1: 如果只进行一个反应, 请把除mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase以外的组分充分混匀后, 再加入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: 体外转录和帽类似物制备的mRNA, 使用前应进行纯化, 并将mRNA重悬于超纯水中。溶液中不应存在EDTA和盐。mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase可与Faustovirus Capping Enzyme (R7051)协同作用, 一步添加Cap-1帽结构至mRNA。

注4: 在与mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase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5: 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。

- f. 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。
- g. 终止反应: 70°C加热10分钟可使mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase失活。
- h. 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. Kuge H, Brownlee GG, Gershon PD, Richter JD. Nucleic Acids Res. 1998. 26(13):3208-14.
2. Devarkar SC, Wang C, Miller MT, Ramanathan A, Jiang F, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016. 113(3):596-601.
3. Lockless SW, Cheng HT, Hodel AE, Quioco FA, Gershon PD. Biochemistry. 1998. 37(23):8564-74.

### 相关产品:

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