货号：BP-04-50

mRNA 加帽试剂盒（50T）

2025V02

产品概述

宝锐生物自主研发的 mRNA 加帽试剂盒，内部含有牛痘病毒加帽酶 Vaccinia Capping Enzyme（VCE）和二氧甲基转移酶 2´-O-Methyltransferase（2OM）。Vaccinia Capping Enzyme 能高效地对 mRNA 的 5'端添加 m7G 帽子，即生产 Cap0 帽结构的 RNA。2´-O-Methyltransferase 对 Cap0 帽结构的 RNA，在帽结构后第一个核苷酸的 2´-O 位置处增加一个甲基，形成 Cap1 帽结构的 RNA。

本试剂盒可在一管反应中同时进行 VCE 和 2OM 加帽，直接获得 Cap1 帽结构 RNA，能极大提高 mRNA 在细胞内的稳定性，促进翻译效率。

试剂组成

组分	货号	体积
Vaccinia Capping Enzyme	BP-E05	50μL
2'-O-Methyltransferase	BP-E06	50μL
10× Capping Buffer	BP-AS-12	100μL
GTP Solution (10mM)	BP-AS-02	50μL
SAM (32mM)	BP-AS-06	25μL
RNase Inhibitor (40U/μL)	BP-E02	50μL
RNase-free ddH_2O	BP-AS-11	1mL

保存条件

-20±5℃存储。

操作说明

1. mRNA 制备

1.1 制备足量的 mRNA，回收后用 RNase-free-ddH_2O 重悬，测定浓度。

1.2 推荐用量：每 50pmol RNA 使用 20μl 体系进行加帽。

1.3 50pmol RNA 含量粗算：RNA 用量(ng)= 0.05nmol×330g/mol×X nt (X=RNA 碱基数)。

2. 加帽反应

2.1 取出 SAM（32mM）放置在冰上解冻，使用时将其稀释至 4mM 添加至反应液；GTP（10mM）和 10×Capping Buffer 室温下解冻即可。由于甲基供体 SAM 属于高能甲基供体，其本身性质不稳定，建议全程在低温下加样。

2.2 加帽反应前建议对 RNA 进行热变性处理，65℃加热 5min，取出后立即冰上放置 5min。

2.3 按下表依次加入各组分：

组分	体积
10× Capping Buffer	2μL
GTP Solution(10mM)	1μL
SAM (4mM)	1μL

Vaccinia Capping Enzyme	1μL
2'-O-Methyltransferase	1μL
RNase Inhibitor	0.5μL
Denatured RNA	50pmoL
RNase-free ddH_2O	Up to 20μL

*37°C孵育 1h 即可完成加帽。若需要使用同等酶量使更多 RNA 加帽，可适当延长 37°C孵育时间至 2h。

2.4 反应终止

70°C加热 10min。

3. 浓度及活性定义：10U/μL

3.1 1U VCE 指 37°C条件下，1 小时将 10pmol GTP 掺入 RNA 上所需的酶量。

3.2 1U 2OM 指 37°C条件下，1 小时将 10pmol 甲基掺入 Gap0 RNA 上所需的酶量。

注意事项

1. 加帽反应对 RNase 高度敏感，反应体系须严格注意不要混入 RNase，实验器材如移液枪头，EP 管严格使用 RNase-free 用品。体系的配制尽可能在无酶环境中配制，可使用清洁后的洁净工作台进行此操作，合成的 RNA 也尽可能避免在洁净工作台以外的区域开盖，以避免 RNase 的污染。
2. 本加帽反应效率受 RNA 5'端结构影响，因此建议通过热变性（65°C加热 5 min，冰上放置 5 min）打开 RNA 5'端的高级结构。
3. 本加帽反应一般可以在 1h 内完成，若 RNA 5'端结构复杂或 RNA 长度较短(≤ 200 nt)，可延长反应时间至 2h。
4. 使用前应混匀，避免反复冻融。