

# mRNA 帽结构 2'-O-甲基转移酶说明书

## (mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase)

【产品中文名称】 mRNA 帽结构 2'-O-甲基转移酶

【产品英文名称】 mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase

【货号信息】

编号	产品组分	货号	包装规格
GMP-MEH-VE101-50 kU	mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase	GMP-MEH-VE101-11	50 U/ $\mu$ l, 50 kU, 1 ml/vial
	10xCapping Buffer	GMP-VCS-VE101-21	1.5 ml/vial
GMP-MEH-VE101-5 MU	mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase	GMP-MEH-VE101-13	50 U/ $\mu$ l, 5 MU, 100 ml/vial
	10xCapping Buffer	GMP-VCS-VE101-23	250 ml/vial

【表达体系】 大肠杆菌

【生产要求】 洁净环境（C 级或 D 级）

【产品级别】 GMP

【产品简介】 mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase 利用 S-腺苷甲硫氨酸(S-Adenosylmethionine, SAM) 为甲基供体，在 mRNA 5' 末端紧挨 Cap0 帽结构的第一个核苷酸的 2'-O 位置进行甲基化，得到 (m7Gppp5'mN) Cap1 帽子结构。本产品是基于公司独特的创新型功能重组蛋白生产平台 SAMS，经过大肠杆菌表达体系与纯化工艺的优化，并按照 GMP 要求生产。

【预期用途】 参与 mRNA 疫苗生产过程中的加帽修饰

【储存缓冲液】 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% Glycerol, 0.1% Triton-X-100, pH 8.0

【贮存条件】 -20±5°C

【mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase 质量标准】

项目	可接受标准
鉴别	样品条带与对照品一致
外观	包装完整、密封性能良好、无渗漏、无破损；溶液澄清
	标签信息印刷清晰，正确无误
	标签黏贴平整、无褶皱或翘起
可见异物	装量 50 ml 及以下，每支/瓶中可见异物不得超过 3 个
	装量 50 ml 以上，每支/瓶中可见异物不得超过 5 个
装量	包装规格为 1 ml/vial，每支/瓶装量不低于 1 ml
	包装规格为 100 ml/vial，每支/瓶装量不低于 100 ml
活性	≥ 67.7 kU/ml
纯度	≥ 95.0%
DNA 酶残留	阴性 (LOD=3)
RNA 酶残留	阴性 (LOD=3)
蛋白酶残留	阴性
重金属残留	≤ 10.0 ppm
镍盐残留	≤ 10.0 ppm
细菌内毒素	≤ 5.0 EU/ml
宿主 DNA 残留	≤ 100.0 pg/mg
宿主蛋白残留	≤ 20.0 ng/mg
微生物限度	≤ 1 CFU/10 ml
pH 值	8.0±0.5

【10×Capping Buffer 质量标准】

项目	可接受标准
外观	包装完整、密封性能良好、无渗漏、无破损；溶液澄清
	标签信息印刷清晰，正确无误。
	标签黏贴平整，无褶皱或翘起
可见异物	装量 50 ml 及以下，每支/瓶中可见异物不得超过 3 个

	装量 50 ml 以上，每支/瓶中可见异物不得超过 5 个
装量	体积规格为 1.5 ml/vial，每支/瓶装量不低于 1.5 ml
	体积规格为 250 ml/vial，每支/瓶装量不低于 250 ml
DNA 酶残留	阴性 (LOD=3)
RNA 酶残留	阴性 (LOD=3)
蛋白酶残留	阴性
细菌内毒素	$\leq 1.0\text{EU/ml}$
重金属残留	$\leq 10.0\text{ ppm}$
微生物限度	$\leq 1\text{ CFU/10 ml}$
pH 值	$7.8\pm 0.5$

## 【产品使用步骤】

## (1) 加帽的 RNA 2'-O 甲基化

- a. 使用 RNase-free Water 将适量的 Capped RNA 稀释至 16  $\mu\text{l}$ ;
- b. 将稀释好的 RNA 于 65°C 条件下加热处理 5 min，结束反应后再冰上放置 5 min;
- c. 配置反应体系，如下表所示：

组分名称	体积
Denatured Capped RNA	16 $\mu\text{l}$
10×Capping Buffer	2 $\mu\text{l}$
SAM (4 mM)	1 $\mu\text{l}$
mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase (50 U/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$

- d. 将上述混合溶液，于 37°C 下孵育 1 h（针对片段长度 < 200 nt 的 RNA，可将孵育时间延长至 2 h）。

## (2) 一步加帽并 2'-O 甲基化

- a. 使用 RNase-free Water 将适量 RNA 稀释至 14  $\mu\text{l}$ ;
- b. 将稀释好的 RNA 于 65°C 条件下加热处理 5 min，结束反应后再于冰上放置 5 min;
- c. 配置反应体系，如下表所示：

组分名称	体积
Denatured uncapped RNA	14 $\mu\text{l}$

10xCapping Buffer	2 $\mu$ l
GTP (10 mM)	1 $\mu$ l
SAM (4 mM)	1 $\mu$ l
Vaccinia Capping Enzyme(10 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase(50 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

d. 将上述混合溶液，于 37°C 孵育 1 h（针对片段长度 < 200 nt 的 RNA，可将孵育时间延长至 2 h）。

提示：以上实验步骤仅建议用于 10  $\mu$ g 以内 RNA ( $\geq$ 100 nt) 的甲基化反应，可根据具体实验需求进行放大。

#### 【注意事项】

- (1) 用于实验参与反应的 RNA 在使用之前，必须进行纯化并溶解于 RNase-free Water，且溶液中不能含有 EDTA 和盐。
- (2) 反应之前推荐 65°C 加热 5 min 可去除 RNA 的二级结构。如果转录产物的 5' 端结构复杂，可将时间延长至 10 min。
- (3) 建议使用 Murine RNase Inhibitor，以增强 RNA 在反应中的稳定性。在反应过程中加入 0.5  $\mu$ l Murine RNase Inhibitor (Cat.No.GMP-RNI-ME101)。

版本号：2023.07.30