

牛痘病毒加帽酶说明书

(Vaccinia Capping Enzyme)

【产品中文名称】牛痘病毒加帽酶

【产品英文名称】Vaccinia Capping Enzyme

【货号信息】

编号	产品组分	货号	包装规格
GMP-VCS-VE101- 10 kU	Vaccinia Capping Enzyme	GMP-VCS-VE101-11	10 U/ μ l, 10 kU, 1 ml/vial
	10xCapping Buffer	GMP-VCS-VE101-21	1.5 ml/vial
GMP-VCS-VE101- 1 MU	Vaccinia Capping Enzyme	GMP-VCS-VE101-13	10 U/ μ l, 1 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】牛痘病毒加帽酶作用于体外转录产物，其具有 RNA 三磷酸酯酶活性、鸟苷酰基转移酶活性和鸟嘌呤甲基转移酶活性，可将 7-甲基鸟嘌呤帽结构（m7Gppp）连接到 mRNA 的 5'末端，催化 mRNA 形成（m7Gppp5'N）Cap0 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 SAMSTM，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, 1 mM DTT, 0.1mM EDTA, 50% Glycerol, 0.1% Triton X-100, pH 8.0

【贮存条件】-20 \pm 5 $^{\circ}$ C

【Vaccinia Capping Enzyme 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	≥ 10.0 kU/ml
纯度	$\geq 95.0\%$
DNA 酶残留	阴性(LOD=3.0)
RNA 酶残留	阴性(LOD=3.0)
蛋白酶残留	阴性
重金属残留	≤ 10.0 ppm
细菌内毒素	≤ 4.0 EU/ml
镍盐残留	≤ 10.0 ppm
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	≤ 1.0EU/ml
重金属残留	≤ 10.0 ppm
微生物限度	≤ 1 CFU/10 ml
pH 值	7.8±0.5

【产品使用步骤】

(1) 加帽反应

本实验步骤适用于 20 μ l 反应体系中 10 μ g mRNA (\geq 100 nt) 的加帽反应，且可根据实验需要放大。

- a) 取 10 μ g mRNA 至 1.5 ml 离心管中，使用 RNase-free Water 稀释至 15 μ l；
- b) 65°C 加热 5 min；
- c) 将加热后的离心管放置冰上 5 min；
- d) 按顺序加入以下组分：

组分名称	体积
经上述处理后的变性 RNA	15 μ l
10×Capping Buffer	2 μ l
GTP (10 mM)	1 μ l
SAM (2 mM)	1 μ l
Vaccinia Capping Enzyme(10 U/ μ l)	1 μ l

- e) 37°C 孵育 30 min，RNA 加帽完成，可进行后续实验；
- f) RNA 被加帽后准备用于下游实验，若 RNA 需要加上一个 poly(A)尾，可使用 KACTUS 产品 *E. coli* Poly(A) Polymerase。

(2) 5' 末端标记反应

本实验步骤适用于 20 μ l 反应体系 5' 末端带有三磷酸的 RNA 标记，且可根据实验需要放大，其标

记效率受反应体系中 RNA 与 GTP 的摩尔浓度比以及 RNA 样本中 GTP 含量的影响。

- a) 取适量的 RNA 至 1.5 ml 离心管中，使用 RNase-free Water 稀释至 14 μ l；
- b) 65°C 加热 5 min；
- c) 将加热后的离心管放置冰上 5 min；
- d) 按顺序加入以下组分：

组分名称	体积
经上述处理后的变性 RNA	14 μ l
10×Capping Buffer	2 μ l
GTP mix	2 μ l
SAM (2 mM)	1 μ l
Vaccinia Capping Enzyme(10 U/ μ l)	1 μ l

备注：GTP mix 为 GTP 和少量标记物，其中 GTP 储液应稀释为反应体系中 mRNA 摩尔浓度的 1-3 倍。

- e) 37°C 孵育 30 min，RNA 5' 末端标记完成，可准备进行后续实验；
- f) RNA 被标记和加帽后用于下游实验，若 RNA 需要加上一个 poly(A)尾，可使用 KACTUS 产品 *E. coli* Poly(A) Polymerase。

【注意事项】

- (1) 用于加帽反应的 RNA 必须经过纯化以及用 RNase-free Water 进行重悬。
- (2) 反应前热处理 RNA，用以去除 5' 末端的二级结构。
- (3) 若已知 RNA 5' 末端结构，可延长反应时间至 60 min，以提高加帽效率。
- (4) 5' 末端标记反应中，GTP 储液应稀释为反应体系中 mRNA 摩尔浓度的 1-3 倍。
- (5) 建议使用 RNase Inhibitor，以增强 RNA 在反应中的稳定性，可以在反应过程中加入 0.5 μ l Murine RNase Inhibitor (Cat.No.GMP-RNI-ME101)。
- (6) 产品应避免反复冻融。

版本号：2023.08.01