

Vaccinia Capping Enzyme

Code No. 2460A **Size: 500 U**
Conc.: 10 U/μl

Supplied Reagents:

10X Capping Buffer **100 μl**
S-adenosylmethionine (SAM) (32 mM) **100 μl**
GTP (10 mM) **50 μl**

Description:

Vaccinia Capping Enzyme is a capping enzyme originating from vaccinia virus and adds a 7-methylguanylate structure (Cap 0) to the 5' end of RNA (5'-triphosphate RNA). In eukaryotes, cap structures are important for stabilization, nuclear export, and translation of mRNAs. This enzyme consists of two subunits (D1 and D12) and has three enzymatic activities (RNA triphosphatase, guanylyltransferase, and guanine methyltransferase). The use of this enzyme together with the reagents included in this product (10X Capping Buffer, S-adenosylmethionine (SAM), and GTP) allows to produce an intact Cap-0 RNA efficiently *in vitro*. Moreover, the use of this enzyme together with mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase (Cat. #2470A/B) allows to produce an intact Cap-1 RNA that have a methyl group at the 2'-O position of the first nucleotide of Cap-0 RNA by a single-step reaction.

Storage: -20°C

Source:

Escherichia coli carrying plasmids containing the genes for vaccinia virus capping enzyme

Properties:

Molecular mass: approx. 98 kDa and 33 kDa (heterodimer)

Unit Definition:

One unit is defined as the amount of enzyme that incorporates 10 pmol of [α -32P] GTP into an RNA transcript in 1 hour at 37°C.

Reaction Mixture for Unit Definition:

1X	Capping Buffer
1 μM	GTP
10 μCi/ml	[α -32P] GTP
0.67 mM	SAM
2.5 μg/50 μl	100 nt RNA

Quality Control Data:

Please see the Certificate of Analysis (CoA) for each lot. You can download the CoA on Takara Bio website.

Applications:

1. Preparation of Cap-0 mRNA
2. Preparation of 5' end-labeled mRNA

Precautions for Use:

1. Don't mix the enzyme vigorously.
2. RNA is less produced or fragmented when reagents, tubes, or pipette tips are contaminated with RNase. Precautions should be taken during experiments to avoid RNase contamination, such as wearing disposable gloves and using tubes and tips exclusively for RNA experiments.

Protocols:

1. Preparation of Cap-0 RNA from uncapped RNA (5'-triphosphate RNA)

Denatured RNA transcript (10 μg)*1,4	15 μl
10X Capping Buffer	2 μl
GTP (10 mM)	1 μl
SAM (2 mM, dilute 32 mM stock to 2 mM)*2	1 μl
Vaccinia Capping Enzyme (10 U/μl)	1 μl
<hr/>	
Total	20 μl*3

Incubate at 37°C for 30 minutes. *4

2. Preparation of Cap-1 RNA from uncapped RNA (5'-triphosphate RNA)

Denatured RNA transcript (10 μg)*1,4	14 μl
10X Capping Buffer	2 μl
GTP (10 mM)	1 μl
SAM (4 mM, dilute 32 mM stock to 4 mM)*2	1 μl
Vaccinia Capping Enzyme (10 U/μl)	1 μl
mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase (50 U/μl)	1 μl
<hr/>	
Total	20 μl*3

Incubate at 37°C for 1 hour. *4

- *1 In order to remove secondary structure on the 5' end of the transcript, heat-denature the RNA (5' triphosphate RNA) prior to the reaction.
 - (1) Take 10 μg of the RNA and adjust the volume to 15 μl (Cap-0 RNA prep) or 14 μl (Cap-1 RNA prep) by RNase-free water.
 - (2) Heat-denature at 65°C for 5 - 10 min, immediately followed by an incubation on ice for 5 min.
- *2 SAM is unstable. Dilute necessary amount of 32 mM stock solution by RNase-free water prior to the reaction, and keep it on ice until use.
- *3 It can be scaled up depending on the amount required.
- *4 If the RNA length is less than 200 nt, extend the incubation time to enhance the capping efficiency (and methylation efficiency) (Cap-0 RNA prep: 30 min → 1 hr, Cap-1 RNA prep: 1 hr → 2 hrs).

Note: RNase inhibitor can be used to enhance the stability of RNA during the reaction. Add at a final concentration of 1 U/μl if necessary.

References:

- 1) Shuman S. *J Biol Chem.* (1990) **265**: 11960-11966.
- 2) Furuichi Y, LaFiandra A, and Shatkin A J. *Nature.* (1977) **266**: 235-239.
- 3) Lewis J D and Izaurralde E. *Eur J Biochem.* (1997) **247**: 461-469.
- 4) Ramanathan A, Bobb G B, and Chan S H. *Nucleic Acids Res.* (2016) **44**: 7511-7526.

Related Products:

Takara IVTpro™ mRNA Synthesis System (Cat. #6141)
Cloning Kit for mRNA Template (Cat. #6143)
Takara IVTpro™ T7 mRNA Synthesis Kit (Cat. #6144)
T7 RNA Polymerase ver.2.0 (Cat. #2541A)
mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase (Cat. #2470A/B)
Recombinant RNase Inhibitor (Cat. #2313A/B)
RNase-free Water (Cat. #9012)
NucleoSpin RNA Clean-up (Cat. #740948.10/.50/.250)*

* Not available in all geographic locations. Check for availability in your area.

IVTpro is a trademark of Takara Bio Inc.

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc. Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from Takara Bio Inc. If you require licenses for other use, please contact us by phone at +81 77 565 6972 or from our website at www.takarabio.com. Your use of this product is also subject to compliance with any applicable licensing requirements described on the product web page. It is your responsibility to review, understand and adhere to any restrictions imposed by such statements. All trademarks are the property of their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions.

Vaccinia Capping Enzyme

Code No. 2460A

容量： 500 U

濃度： 10 U/ μ l

添付試薬：

10×Capping Buffer 100 μ l
S-adenosylmethionine (SAM) (32 mM) 100 μ l
GTP (10 mM) 50 μ l

●製品説明

Vaccinia Capping Enzyme は、vaccinia ウイルス由来のキャップ化酵素であり、RNA (5'-triphosphate RNA) の 5' 末端に 7-methylguanylate cap 構造 (Cap 0) を付加する。真核生物においてキャップ構造は、mRNA の安定化、核外輸送、および翻訳において重要である。2つのサブユニット (D1 および D12) からなる本酵素は、3つの酵素活性 (RNA トリホスファターゼ、グアニリルトランスフェラーゼ、およびグアニンメチルトランスフェラーゼ) を持ち、本製品に含まれる試薬 (10×Capping Buffer、S-adenosylmethionine (SAM)、および GTP) と共に用いることで、完全な Cap 0 構造を持つ RNA を *in vitro* において調製できる。また、本酵素を mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase (製品コード 2470A/B) と同時に用いることで、Cap-0 RNA の 1 番目のヌクレオチドの 2'-O 部位がメチル化された Cap 1 構造を持つ RNA をシングルステップ反応で調製できる。

●保存 - 20°C

●起源

Escherichia coli carrying plasmids containing the genes for vaccinia virus capping enzyme

●一般的性質

質量： 約 98 kDa および 33 kDa (ヘテロダイマー)

●活性の定義

37°Cにおいて1時間に10 pmolの $[\alpha$ -32P] GTPをRNA転写物に取り込む酵素量を1Uとする。

●活性測定用反応液組成

1×	Capping Buffer
1 μ M	GTP
10 μ Ci/ml	$[\alpha$ -32P] GTP
0.67 mM	SAM
2.5 μ g/50 μ l	100 nt RNA

●品質管理データ

性能試験結果については、各ロットのCertificate of Analysis (CoA) をご覧ください。CoAはタカラバイオウェブサイトからダウンロードできます。

●用途

1. Cap 0 構造を持つ mRNA の調製
2. 5' 末端標識 mRNA の調製

●使用上の注意

1. 本酵素の激しい攪拌は行わないでください。
2. 基質となる RNA や試薬、反応に使用するチューブ、マイクロピペット用チップなどに RNase が混入した場合、反応後に得られる RNA の収量が低下したり、RNA が断片化します。反応に使用するチューブ、マイクロピペット用チップは専用のものとし、反応を行うときはディスプレイ手袋を着用して、RNase が混入しないように注意してください。

●操作

1. Uncapped RNA (5'-triphosphate RNA) から Cap-0 RNA の調製	
Denatured RNA transcript (10 μ g)*1,4	15 μ l
10×Capping Buffer	2 μ l
GTP (10 mM)	1 μ l
SAM (2 mM, dilute 32 mM stock to 2 mM)*2	1 μ l
Vaccinia Capping Enzyme (10 U/ μ l)	1 μ l
Total	20 μ l*3

37°Cで30分インキュベーションする。*4

2. Uncapped RNA (5'-triphosphate RNA) から Cap-1 RNA の調製	
Denatured RNA transcript (10 μ g)*1,4	14 μ l
10×Capping Buffer	2 μ l
GTP (10 mM)	1 μ l
SAM (4 mM, dilute 32 mM stock to 4 mM)*2	1 μ l
Vaccinia Capping Enzyme (10 U/ μ l)	1 μ l
mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase (50 U/ μ l)	1 μ l
Total	20 μ l*3

37°Cで1時間インキュベーションする。*4

*1：使用する RNA (5'-triphosphate RNA) は 5' 末端が複雑な 2 次構造を取る場合に備え、反応前に熱変性する。

(1) 精製 RNA 10 μ g を RNase-free water で 15 μ l (Cap-0 RNA 調製) あるいは 14 μ l (Cap-1 RNA 調製) に調製する。

(2) 65°C、5～10分で熱変性した後、5分氷冷する。

*2：SAM は不安定であるため、反応前に必要分を 32 mM のストック溶液から RNase-free water で希釈調製する。希釈液は反応まで氷上で保存する。

*3：必要に応じてスケールアップ可能。

*4：RNA の長さが 200 nt 以下である場合は、cap 付加効率 (およびメチル化効率) を上げるため反応時間を延長する (Cap-0 RNA 調製：30分→1時間、Cap-1 RNA 調製：1時間→2時間)。

注：反応液中の RNA を安定的に保つため、RNase inhibitor が使用できます。使用する場合は、最終濃度が 1 U/ μ l となるように添加してください。

●参考文献

- 1) Shuman S. *J Biol Chem.* (1990) **265**: 11960-11966.
- 2) Furuichi Y, LaFiandra A, and Shatkin A. *J. Nature.* (1977) **266**: 235-239.
- 3) Lewis J D and Izaurralde E. *Eur J Biochem.* (1997) **247**: 461-469.
- 4) Ramanathan A, Bobb G B, and Chan S H. *Nucleic Acids Res.* (2016) **44**: 7511-7526.

●関連製品

Takara IVTpro™ mRNA Synthesis System (製品コード 6141)
Cloning Kit for mRNA Template (製品コード 6143)
Takara IVTpro™ T7 mRNA Synthesis Kit (製品コード 6144)
T7 RNA Polymerase ver.2.0 (製品コード 2541A)
mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase (製品コード 2470A/B)
Recombinant RNase Inhibitor (製品コード 2313A/B)
RNase-free Water (製品コード 9012)
NucleoSpin RNA Clean-up (製品コード 740948.10/50/250)
TransIT-mRNA Transfection Kit
(製品コード MIR2225/MIR2250/MIR2255/MIR2256)

●注意

本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
本データシートに記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

v202208Da

タカラバイオ株式会社

ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999
Fax 077-565-6995