

KACATUS

mRNA疫苗及細胞& 基因治療所需原料酶

level
Discovering
new boundaries

進階生物科技股份有限公司

服務專線：0800-251302

TABLE OF CONTENTS

mRNA疫苗相關原料酶	-----	02
環狀RNA疫苗相關原料酶	-----	12
基因治療相關產品	-----	14
其它酶類產品	-----	27

mRNA疫苗相關原料酶

mRNA疫苗的工作原理是將含有編碼目標蛋白的mRNA片段，以特殊的脂質膜包裹，注入人體細胞內產生抗原，再由此激發特異性免疫反應，達到形成免疫記憶的效果。相比於其它疫苗來說，具有安全性高、保護率高、研發週期短、生產效率高等優勢。

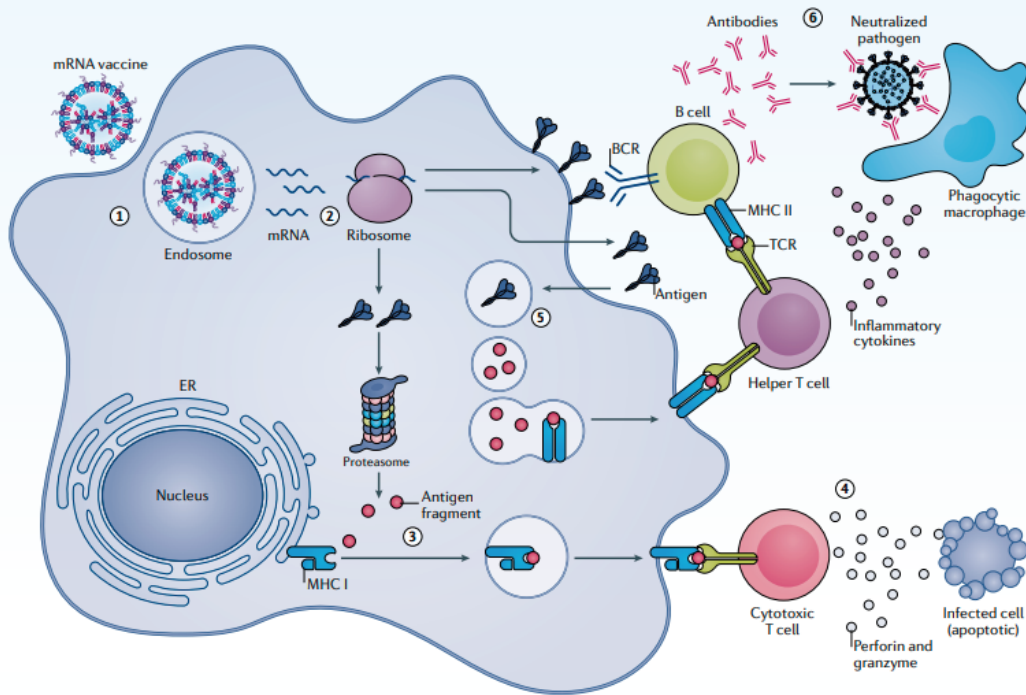
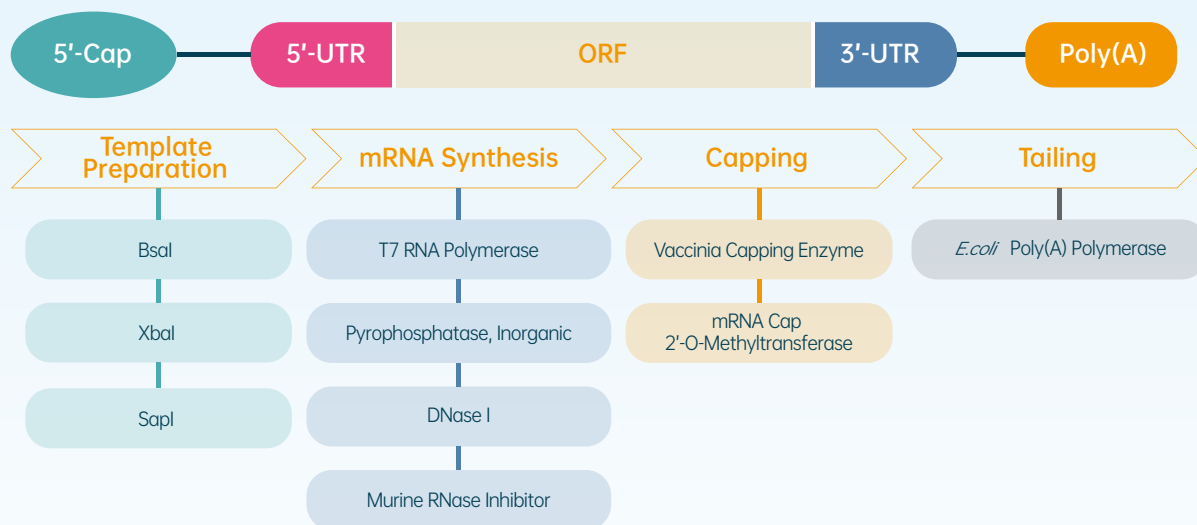


Fig.1 mRNA疫苗作用機理^[1]

mRNA疫苗的開發生產包括序列設計、mRNA體外合成、mRNA包封等步驟。其中，mRNA體外合成所需的原料酶對於生產高品質的mRNA疫苗起著至關重要的作用。愷佶生物提供全系列的GMP&非GMP原料酶，助力mRNA疫苗的產業化生產。

愷佶生物mRNA體外合成解決方案



產品清單

貨號	產品名稱	規格
BSA-EE101	Bsal(20U/μl)	1000U/5000U
GMP-BSA-EE101	Bsal(20U/μl)(GMP grade)	20kU/400kU
XBA-EE101	XbaI(20U/μl)	2000U/20kU
SAP-SE101	SapI(10U/μl)	1000U/10kU
T7P-EE101	T7 RNA Polymerase(50U/μl)	5000U/25kU
T7P-EE102	T7 RNA Polymerase Kit(50U/μl)	5000U/25kU
T7M-EE101	T7 RNA Polymerase Kit Plus(50U/μl)	5000U
T7C-EE101	T7 Co-transcription RNA Synthesis Kit(50U/μl)	10kU
GMP-T7P-EE101	T7 RNA Polymerase(50U/μl)(GMP grade)	50kU/1MU
VCS-VE101	Vaccinia Capping Enzyme(10U/μl)	500U/5000U
GMP-VCS-VE101	Vaccinia Capping Enzyme(10U/μl)(GMP grade)	10kU/1MU
MEH-VE101	mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase(50U/μl)	2500U/25kU
GMP-MEH-VE101	mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase(50U/μl)(GMP grade)	50kU/5MU
DNI-EE001	DNase I(4U/μl)	1000U/5000U
GMP-DNI-EE001	DNase I(4U/μl)(GMP grade)	4000U/40kU
RNI-ME001	Murine RNase Inhibitor(40U/μl)	2000U/10kU
GMP-RNI-ME101	Murine RNase Inhibitor(40U/μl)(GMP grade)	40kU/2.2MU
PYR-EE201	Pyrophosphatase, Inorganic(0.1U/μl)	10U/50U
GMP-PYR-YE101	Pyrophosphatase, Inorganic(0.1U/μl)(GMP grade)	100U/800U
PLA-EE101	<i>E. coli</i> Poly(A) Polymerase(5U/μl)	100U/500U

線性範本製備

mRNA體外轉錄的範本通常是質粒，在體外轉錄前需要對質粒進行線性化處理，因為轉錄反應會延續至DNA範本的末端，環狀質粒範本會轉錄生成大小不同的mRNA轉錄本，線性化可以確保獲得確定長度及序列的mRNA轉錄本。

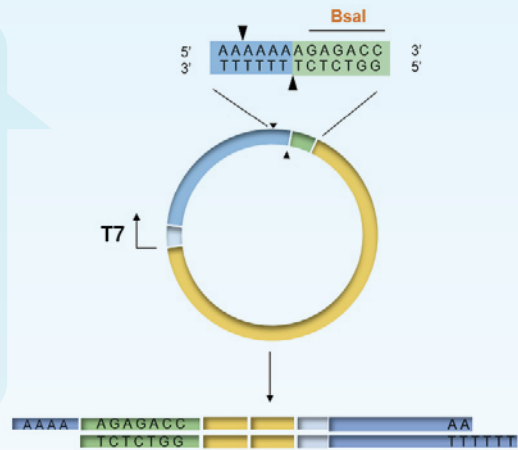


Fig.2 BsaI製備線性範本

相關產品

BsaI (DMF Filled)

線性化範本可通過限制性內切酶酶切質粒獲得，需確保酶切產物為平末端或5'端突出結構。需使用IIS型限制性內切酶，IIS型限制性內切酶的酶切位點在識別位點以外，酶切完5'端突出。BsaI屬於IIS型限制性內切酶，它的識別位點為6個碱基組成，具有高度特異性而極不容易出現‘類’酶切位點，能夠有效避免出現非特異性的酶切。BsaI DMF備案編號為037503。

產品資料

BsaI酶切活性強

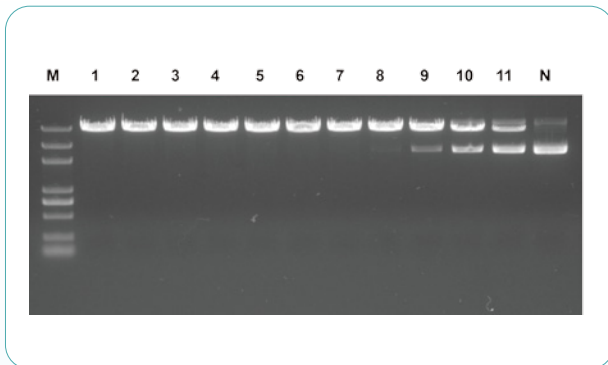


Fig.3 BsaI酶切活性檢測，20 μ l體系加入1 μ g質粒，1 μ l BsaI (1孔為原液，1-11孔依次2倍梯度稀釋)，酶切30分鐘。

酶切16小時，無星活性

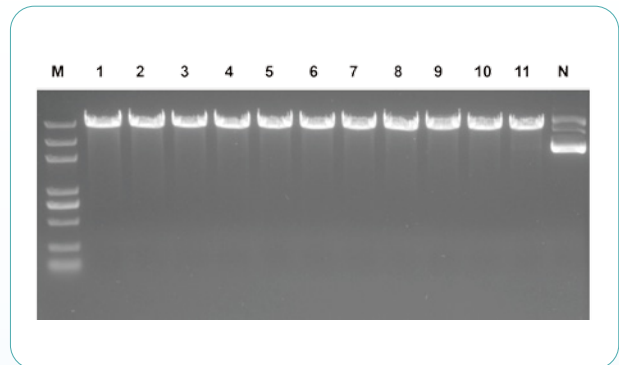


Fig.4 BsaI星活性檢測，20 μ l體系中加入1 μ g質粒，1 μ l BsaI (1孔為原液，1-11孔依次2倍梯度稀釋)，酶切16小時。

產品資訊

貨號	產品名稱	規格
BSA-EE101	BsaI(20U/ μ l)	1000U/5000U
GMP-BSA-EE101	BsaI(20U/ μ l) (GMP grade)	20kU/400kU

XbaI

XbaI限制性內切酶可用於線性範本製備，其酶切位點為T/CTAGA。

產品資料

XbaI高效酶切質粒DNA

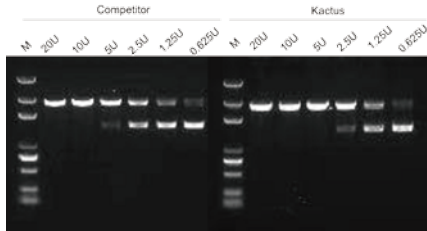


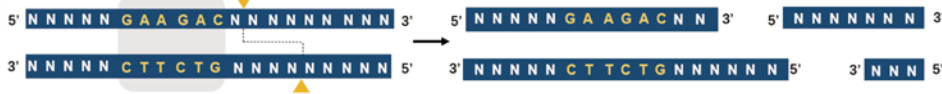
Fig.5 恆佳生物XbaI酶切效果優於某知名供應商。50μl反應體系中加入1μg質粒，不同酶量的XbaI(如圖)，酶切30分鐘。

產品資訊

貨號	產品名稱	規格
XBA-EE101	XbaI(20U/μl)	2000U/20kU

SapI

SapI是一種IIS型限制性內切酶，能識別非回文DNA序列，並在識別序列之外進行切割產生粘性末端。同裂酶有BspQI、PciSI、LglI。SapI識別位點和切割位點如下：



產品資料

SapI酶切效果優於某知名供應商，酶切16小時無星活性

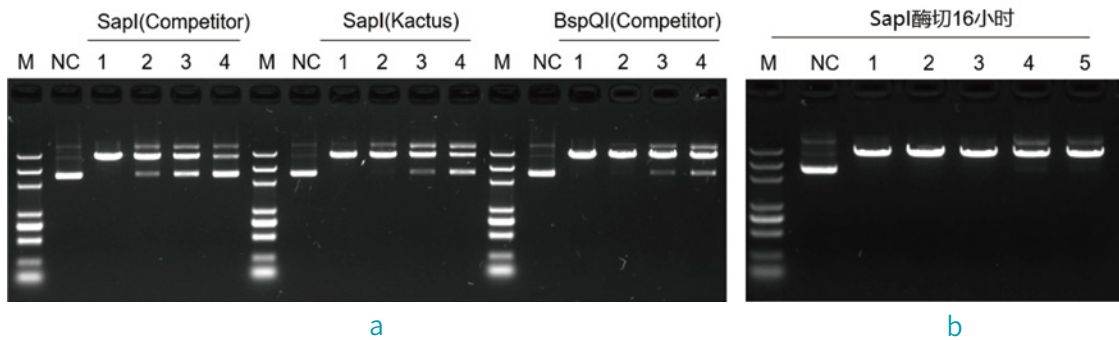


Fig.6 SapI酶切效果優於某知名供應商，且與其BspQI酶切效果基本相當。在50μl標準反應體系中加入1μg質粒，1μl SapI/BspQI (NC孔為對照組，1-4孔依次2倍梯度稀釋)，分別於37°C/50°C酶切15分鐘 (a)；SapI 37°C酶切16小時無星活性，在50μl標準反應體系中加入1μg質粒，1μl SapI (NC孔為對照組，1-5孔依次2倍梯度稀釋) (b)。

產品資訊

貨號	產品名稱	規格
SAP-SE101	SapI(10U/μl)	1000U/10kU

mRNA體外轉錄

體外轉錄 (in vitro transcription, IVT) 是以線性化質粒為範本, 在RNA轉錄酶、NTP等條件下, 模仿體內轉錄過程生成mRNA的技術。質粒範本通常使用的啟動子為T7啟動子, 其轉錄強度較高, 是目前原核表達應用最廣泛的啟動子。T7 RNA Polymerase (T7 RNA聚合酶) 對T7啟動子具有高度特異性, 且其活性較高, 在Inorganic Pyrophosphatase、Murine RNase Inhibitor、DNase I的輔助下, 合成高產量的mRNA。

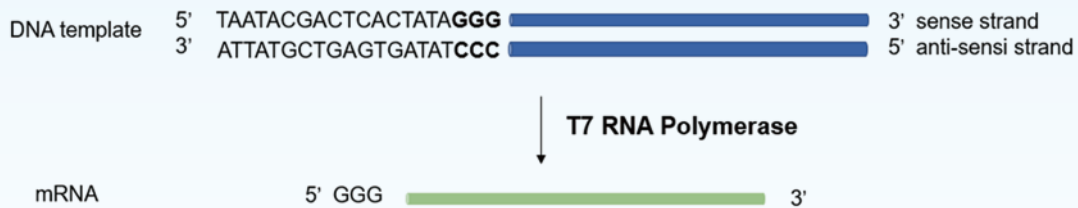


Fig.7 T7 RNA Polymerase用於IVT反應

相關產品

T7 RNA Polymerase (DMF Filed)

本品為大腸桿菌重組表達的T7噬菌體DNA編碼的蛋白, 是一種高度特異性識別T7啟動子序列 (5' -TAATACGACTCACTATAGGG-3') 的DNA依賴的5'→3' RNA聚合酶。以含有T7啟動子序列的單鏈或雙鏈DNA為範本, NTP為底物, 合成與啟動子下游的單鏈DNA或雙鏈DNA範本鏈互補的RNA。T7 RNA Polymerase DMF備案編號為037660。

產品資料

高效轉錄不同長度的mRNA

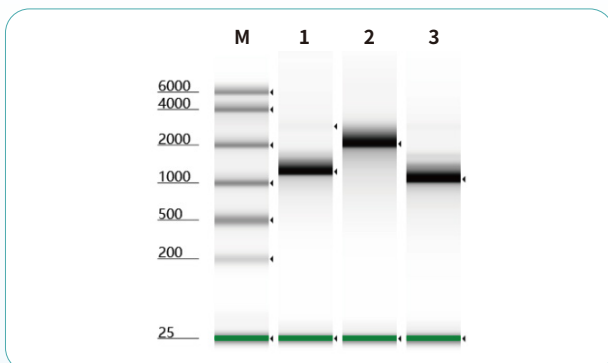


Fig.8 T7 RNA Polymerase轉錄效率檢測, 在20μl體系中, 分別以3個質粒 (1帶poly (A) 尾, 2、3不帶poly (A) 尾) 為範本, 37°C下反應2小時, 轉錄長度分別為2000nt、4000nt、2000nt。

三批產品活性檢測

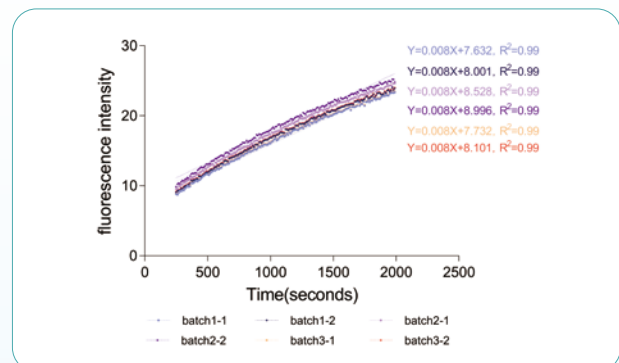


Fig.9 探針法檢測T7 RNA Polymerase活性, 檢測原理為當探針和轉錄產物特異性結合後構象改變, 螢光強度發生變化; 分別檢測3批次的T7 RNA Polymerase, 各重複兩次實驗, 其斜率基本一致, 三批次的T7 RNA Polymerase活性穩定。

產品資訊

貨號	產品名稱	規格
T7P-EE101	T7 RNA Polymerase(50U/μl)	5000U/50kU
T7P-EE102	T7 RNA Polymerase Kit(50U/μl)	5000U/25kU
T7M-EE101	T7 RNA Polymerase Kit Plus(50U/μl)	5000U
T7C-EE101	T7 Co-transcription RNA Synthesis Kit(50U/μl)	10kU
GMP-T7P-EE101	T7 RNA Polymerase(50U/μl) (GMP grade)	50kU/1MU

Pyrophosphatase, Inorganic

本品是重組大腸桿菌表達酵母來源的無機焦磷酸酶 (PPase)，催化一分子焦磷酸鹽轉化為兩分子磷酸鹽離子，使無機焦磷酸鹽水解生成正磷酸鹽。在分子生物學中可用於體外轉錄反應中提高mRNA產量。

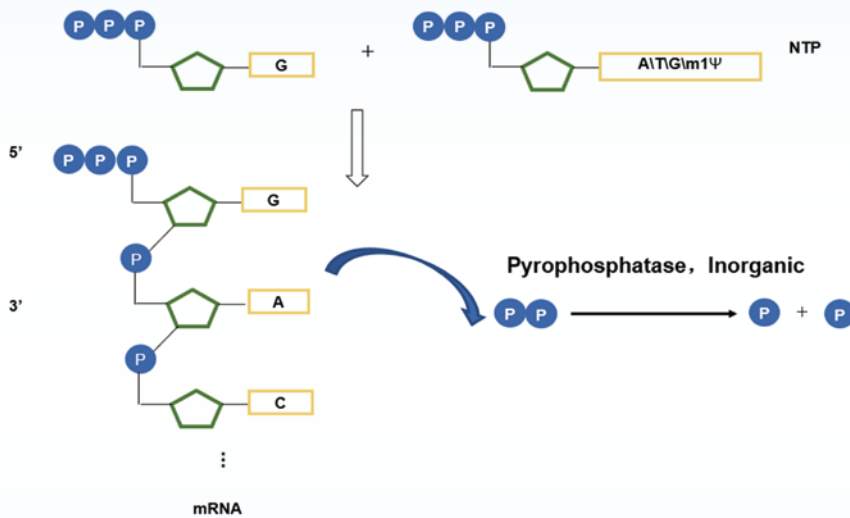


Fig.10 Pyrophosphatase, Inorganic作用機理

產品資料

無機焦磷酸酶可有效提高mRNA的產量

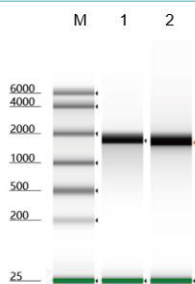


Fig.11 Pyrophosphatase, Inorganic有效提高mRNA的產量。在20μl的體外轉錄體系中額外加入無機焦磷酸酶，1孔未加焦磷酸酶，2孔加焦磷酸酶。

產品資訊

貨號	產品名稱	規格
PYR-EE201	Pyrophosphatase, Inorganic(0.1U/μl)	10U/50U
GMP-PYR-YE101	Pyrophosphatase, Inorganic(0.1U/μl)(GMP grade)	100U/800U

Murine RNase Inhibitor

本品是在大腸桿菌中表達純化的Murine RNase Inhibitor, 能抑制 RNase A, RNase B 或 RNase C 這三種酶的活性, 主要參與mRNA體外轉錄中對mRNA的保護。

產品資訊

貨號	產品名稱	規格
RNI-ME001	Murine RNase Inhibitor(40U/μl)	2000U/10kU
GMP-RNI-ME101	Murine RNase Inhibitor(40U/μl)(GMP grade)	40kU/2.2MU

DNase I

DNase I是一種可消化單鏈或雙鏈DNA的去氧核糖核酸內切酶, 它識別並切割磷酸二酯鍵, 產生5'-磷酸基團和3'-OH的單去氧核苷酸或單鏈或雙鏈的寡去氧核苷酸。

產品資料

DNase I酶活性高, 可高效消化DNA

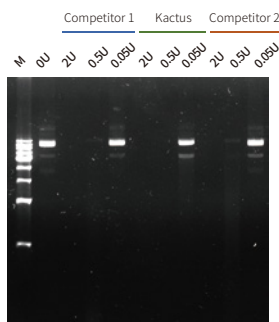


Fig.12 DNase I消化DNA效果, 在20μl體系中加入1μg的DNA與不同酶量的DNase I, 與競品1、2對比, 恆作生物DNase I消化性能更優。

產品資訊

貨號	產品名稱	規格
DNI-EE001	DNase I(4U/μl)	1000U/5000U
GMP-DNI-EE001	DNase I(4U/μl)(GMP grade)	4000U/40kU

mRNA加帽系統

體外轉錄的mRNA的5'端含有三磷酸基團，具有很強的免疫原性，若將其遞送至體內，會啟動固有免疫應答，RIG-1會識別三磷酸基團，導致其無法在體內正確翻譯出抗原蛋白。因此，在工業生產中需對mRNA進行加帽修飾以逃避固有免疫系統。使用酶法進行加帽，首先應使用Vaccinia Capping Enzyme將mRNA修飾成(m7Gppp5'N) Cap0帽子結構，它對翻譯起始因數eIF4的招募過程有著非常重要的作用，而且可有效防止mRNA被降解；再進一步使用mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase，在mRNA 5'末端緊挨Cap0帽結構的第一個核苷酸的2'-O位置進行甲基化，得到(m7Gppp5'mN) Cap1帽子結構，Cap1的免疫原性比Cap0低，不易被RNA sensors識別。

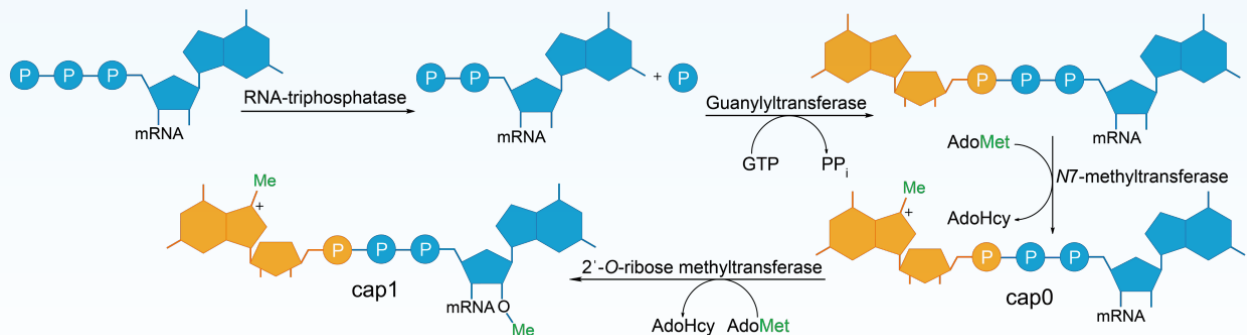


Fig.13 mRNA酶法加帽，Vaccinia Capping Enzyme行使三種酶的功能，分別為RNA-triphosphatase (RNA三磷酸酯酶)、Guanylyltransferase (鳥苷醯基轉移酶) 和N7-methyltransferase (鳥嘌呤甲基轉移酶)，得到Cap0 mRNA結構，mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase催化Cap0結構得到Cap1 mRNA結構^[2]。

產品資料

愷佶生物LC-MS平臺檢測Cap1加帽率，加帽率超過99%

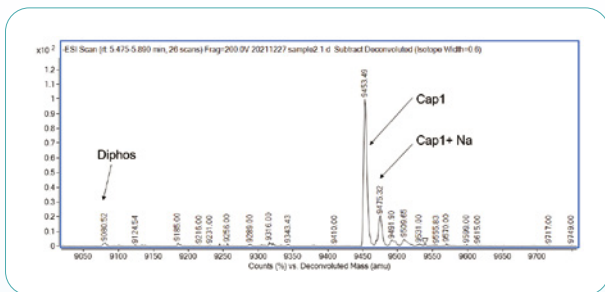


Fig.14 愷佶生物LC-MS平臺檢測Cap1加帽率

	Mass	Area	%
Cap1	9453.4903	29019369	99.01%
Cap1+Na	9475.3221	9988746	
5'-monophosphate	/	/	/
5'-diphosphate	9080.5199	390758	0.99%
5'-triphosphate	/	/	/

產品資訊

貨號	產品名稱	規格
VCS-VE101	Vaccinia Capping Enzyme(10U/μl)	500U/5000U
GMP-VCS-VE101	Vaccinia Capping Enzyme(10U/μl)(GMP grade)	10kU/1MU
MEH-VE101	mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase(50U/μl)	2500U/25kU
GMP-MEH-VE101	mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase(50U/μl)(GMP grade)	50kU/5MU

mRNA加尾修飾

mRNA的修飾除了加帽修飾還有加尾修飾, poly(A) 尾可以穩定mRNA的結構, 也可以為mRNA識別核糖體提供信號, 從而提高翻譯效率。體外轉錄mRNA的加尾方式有兩種, 一種是在設計序列的時候就引入poly(A) 序列, 一種是使用 *E.coli* Poly(A) Polymerase進行加尾。



Fig.15 *E. coli* Poly(A) Polymerase加尾機理

E. coli Poly(A) Polymerase

本品是由大腸桿菌重組表達的Poly(A) Polymerase, 催化ATP以AMP的形式添加至mRNA的3' 端。

產品資料

E. coli Poly(A) Polymerase可高效加尾

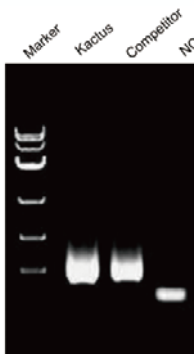


Fig.16 Poly(A)聚合酶加尾效果與競品對比。在20μl體系中加入1μg mRNA和5U酶, 加尾效果與競品基本一致。

產品資訊

貨號	產品名稱	規格
PLA-EE101	<i>E. coli</i> Poly(A) Polymerase(5U/μl)	100U/500U

愷佶生物根據客戶需求提供加帽、加尾測定定制服務

加帽檢測

階段	客戶	愷佶生物
1	提供DNA範本	體外轉錄、加帽
2	提供mRNA序列以及加帽後的mRNA 樣品	設計並合成probe
3	提供probe和加帽後的mRNA樣品	一系列處理，得到上機樣品
4	提供可直接上機的樣品	上機，提供分析報告

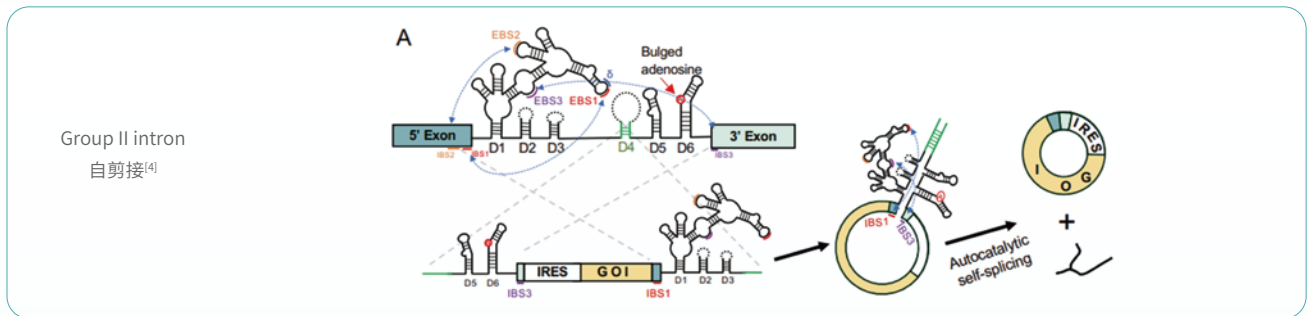
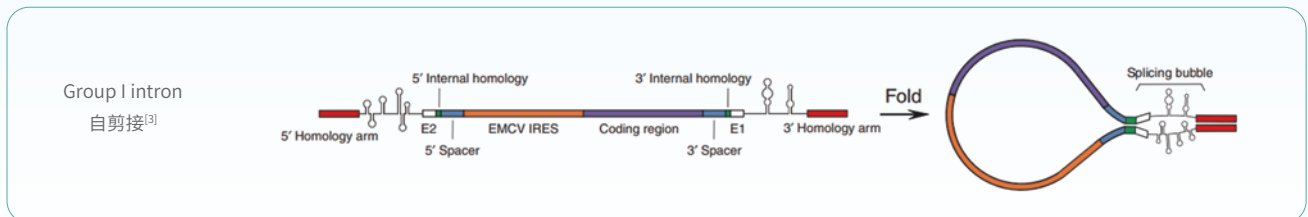
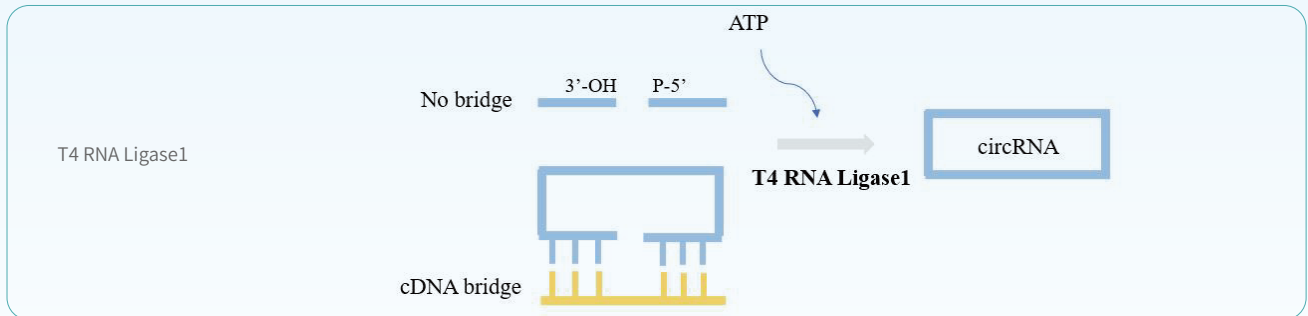
加尾檢測

客戶	愷佶生物
提供上機樣品	上機，提供分析報告

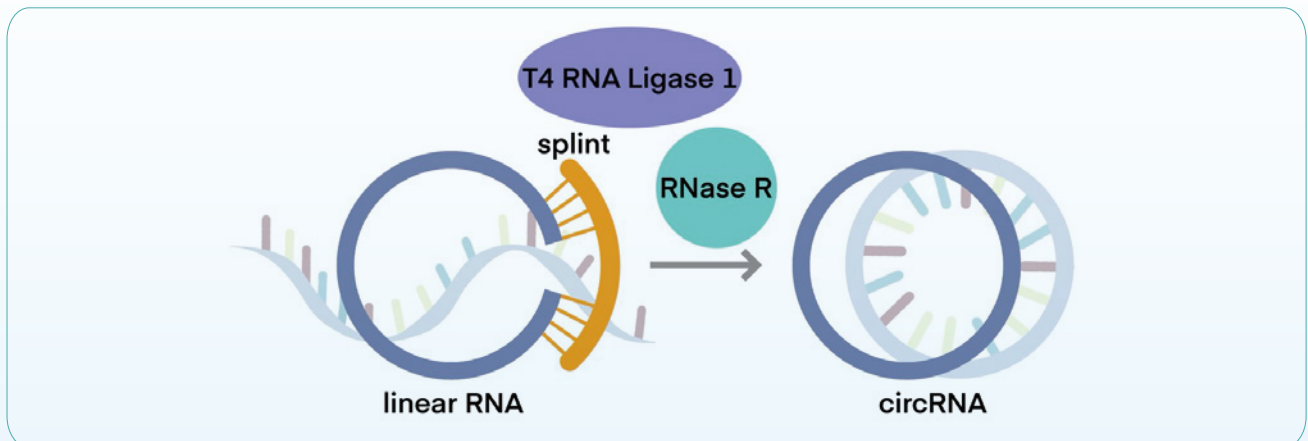
環狀RNA疫苗相關原料酶

環狀RNA (circRNA) 普遍存在於各類生物中, 其分子呈共價閉環結構, 具有線性RNA (linear RNA) 無法比擬的穩定性, 極大程度避免了核酸外切酶對它的降解。對於circRNA疫苗來說, 需要注意兩個關鍵問題: 一是需提高體外環化的效率, 二是需關注circRNA的免疫原性。目前, 常用的體外環化方式主要有以下幾種:

體外環化方式



愷佻生物可提供T4 RNA ligase1和RNase R用於體外RNA環化及純化處理。



產品資料

RNase R可高效消化linear RNA，並對circRNA無影響

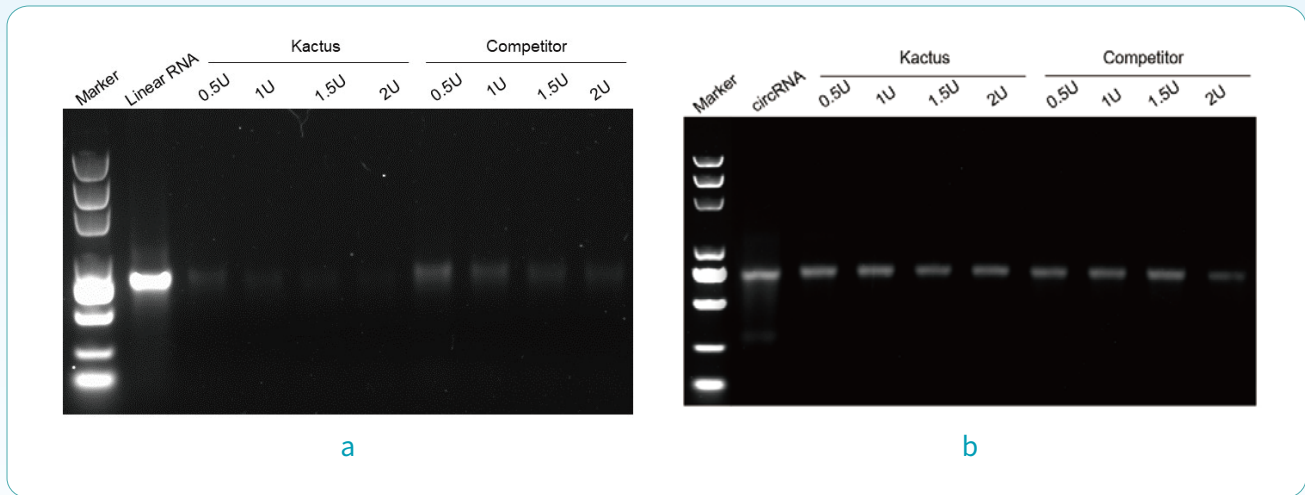


Fig.17 RNase R消化linear RNA和circRNA的作用效果，在20 μ l體系中，加入1 μ g RNA和不同酶量的RNase R，結果顯示RNase R可有效消化linear RNA(a)，對circRNA無影響(b)。

產品資訊

貨號	產品名稱	規格
TRL-BE101	T4 RNA Ligase1(30U/ μ l)	3000U/30kU
RNR-EE001	RNase R(20U/ μ l)	2000U/20kU

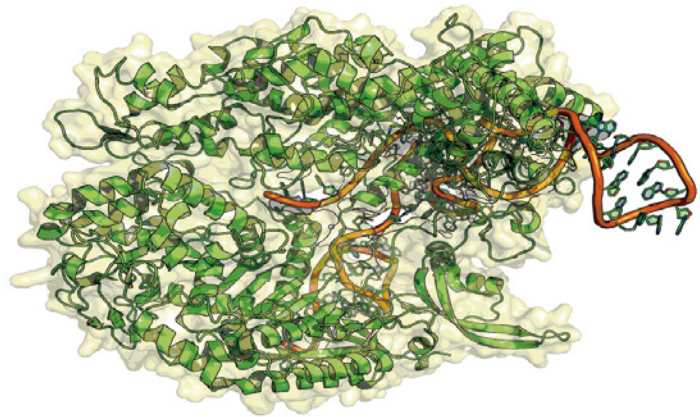
基因治療相關產品

——基因編輯酶

基因編輯技術已歷經幾代革新，從最初的ZFNs(zinc-finger nucleases)技術、TALENs (transcription activator-like effector nucleases)技術到CRISPR-Cas技術，再到BE (base editing)技術及PE (prime editing)技術等，極大地提高了人類對真核細胞的基因組進行精準改造的能力。其中，CRISPR-Cas系統由於設計和操作簡便，已成為基因治療領域中重要的技術手段。愷佻生物自主開發了GMP級Cas9核酸酶以及高活性的Cas12a核酸酶，其中，Cas9核酸酶已完成美國FDA DMF備案（編號：036578），加速基因治療藥物申報。

愷佻生物GMP級Cas9核酸酶 (DMF Filed)

愷佻生物基於 Structure Aided Design and Multiplex Screening SAMSTTM平臺，通過蛋白結構分析、表達工藝篩選、純化工藝優化、製劑配方開發等一系列步驟，成功開發出高活性Cas9核酸酶。



產品特點

GMP 廠房生產、藥典標準放行檢測

高標準的CGT蛋白酶GMP生產車間

體外胞內雙重驗證，確保蛋白高活性

MES數位化生產管理體系

良好的批間穩定性和一致性

高標準的無菌檢測和穩定性研究

按照藥典標準的檢測方法學開發和驗證

符合細胞和基因治療申報要求，可提供申報用檔

產品純度

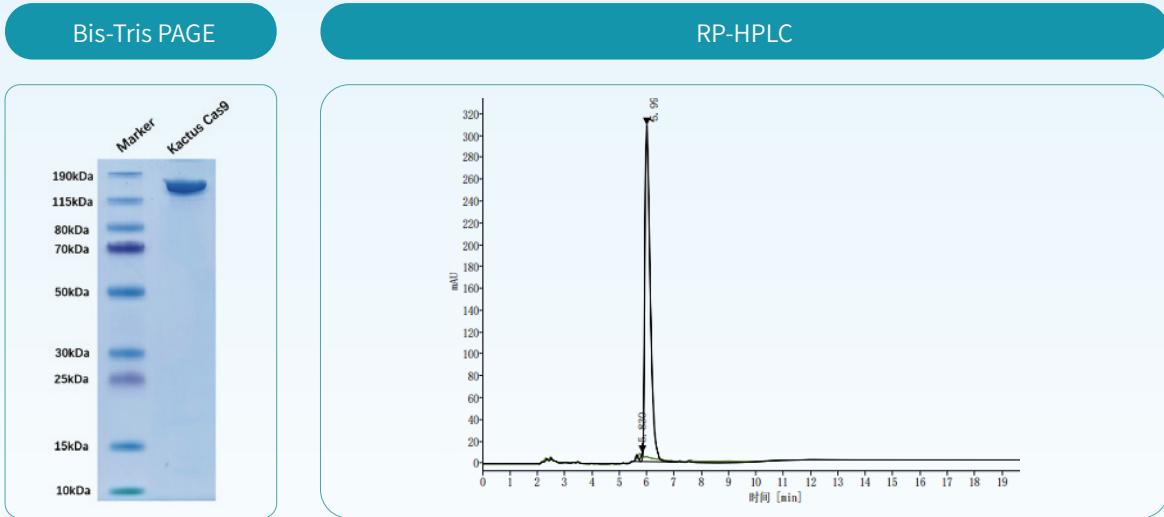


Fig.18 Bis-Tris PAGE和RP-HPLC檢測Kactus Cas9核酸酶的純度高於95%。

體外和胞內活性評價

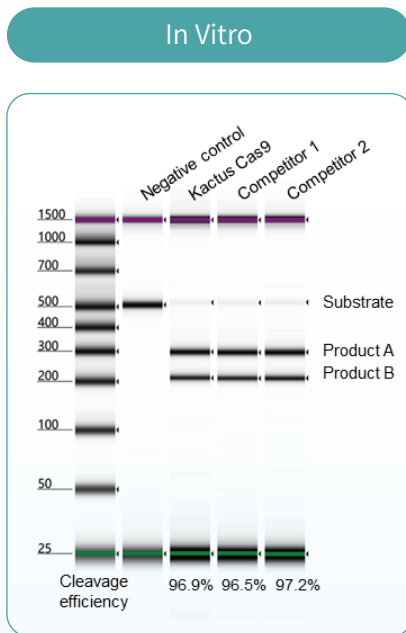


Fig.19 Cas9核酸酶通過體外切割實驗，切割底物DNA標準品；如圖結果顯示Kactus Cas9核酸酶和國外知名品牌Cas9核酸酶的切割活性相當。

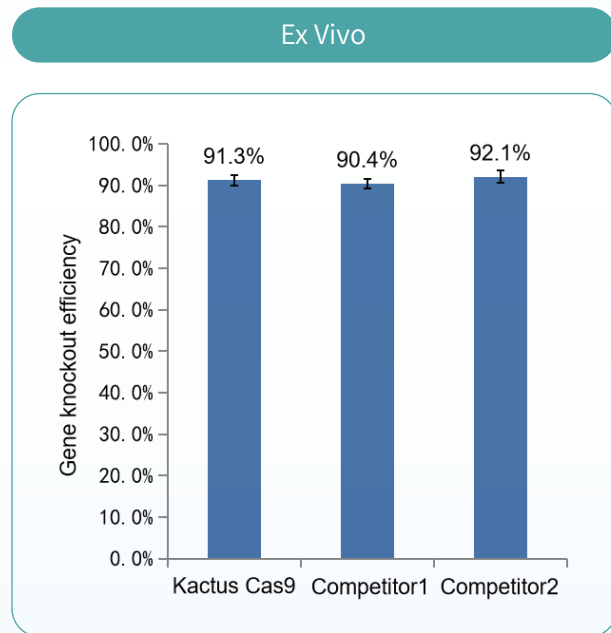
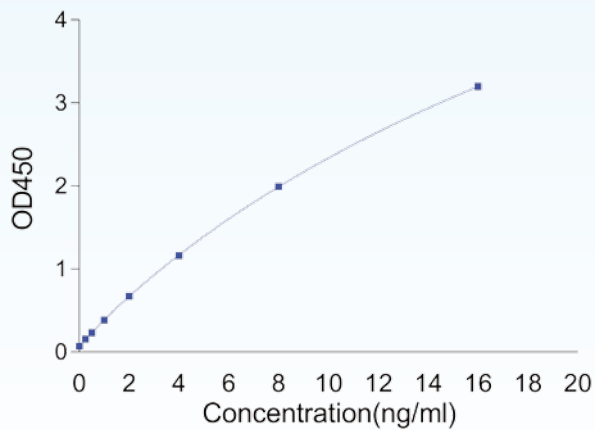


Fig.20 Cas9核酸酶用於293T細胞系的基因敲除；如圖結果顯示Kactus Cas9核酸酶與國外知名品牌Cas9核酸酶在細胞內的基因敲除效率相當。

愷佶生物CRISPR/Cas9 Nuclease ELISA kit

在ex vivo基因治療中，細胞經CRISPR/Cas9系統改造後，在回輸人體之前需對細胞中Cas9核酸酶的殘留進行檢測。為此，愷佶生物精心開發了高靈敏、高特異性的殘留檢測試劑盒CRISPR/Cas9 Nuclease ELISA Kit，其檢測範圍為0.25ng/ml-16ng/ml，靈敏度可達0.125ng/ml。

標準曲線繪製



產品資訊

貨號	產品名稱	種屬	規格
KACTUS-CAS9	CRISPR-Cas9 Nuclease(10mg/ml)	<i>S.pyogenes</i>	1mg/3mg
KACTUS-CAS9-GMP	CRISPR-Cas9 Nuclease(10mg/ml)(GMP grade)	<i>S.pyogenes</i>	3mg
CAS-MM00B	CRISPR-Cas9 Nuclease ELISA Kit	/	96T
CAS-EE111	Recombinant S.p.Cas9 D10A Nickase(10mg/ml)	<i>S.pyogenes</i>	1mg
CAS-EE121	Recombinant A.s.Cas12a Nuclease(10mg/ml)	<i>Acidaminococcus sp. BV3L6</i>	1mg

基因治療相關產品

—MaxNuclease全能核酸酶 (DMF Filed)

愷佶生物MaxNuclease是來自於 *Serratia Marcescens* 的廣譜核酸酶,可降解雙鏈、單鏈、環狀和線性RNA和DNA等任意形式的核酸,將它們消化為3-5個碱基長度的5'-單磷酸寡核苷酸。本品利用 *E. coli* 大規模發酵表達純化,生產過程完全按照GMP生產標準進行,是病毒類疫苗、病毒載體治療等行業中去除核酸的不二選擇!MaxNuclease DMF備案編號為036799。

產品特點

GMP級別產品,藥典標準放行檢測,滿足從研發到商業大規模生產的使用需求

按照藥典標準的檢測方法學開發和驗證,未使用抗生素和動物源原材料

高標準的CGT原料酶GMP生產車間

高純度、高活性,可消化任何形式的DNA和RNA

符合申報要求,可提供申報用檔

主要應用

01

基因治療領域
去除核酸

如AAV純化

02

病毒類疫苗
去除外源核酸

降低核酸殘留的風險

03

去除病毒顆粒
表面的核酸

如慢病毒的純化

04

藥物純化過程中
去除核酸

提高蛋白回收產量

MaxNuclease品質控制

序號	項目	標準	檢測方法
1	外觀	無色透明溶液	目視檢查
2	活性	$\geq 250\text{U}/\mu\text{l}$	消化鮭魚精DNA法
3	比活	$\geq 1.1 \times 10^6 \text{ U}/\text{mg}$	活性和蛋白質質量濃度比值
4	純度	$\geq 95\%$	Bis-Tris PAGE
5	純度	$\geq 99\%$	SEC-HPLC
6	蛋白酶殘留	無檢出	蛋白酶活性試劑盒檢測
7	重金屬殘留	$\leq 10\text{ppm}$	中國藥典2020版第四部重金屬檢查法通則 (0821)
8	細菌內毒素含量	$\leq 0.01\text{EU}/\text{kU}$	顯色法
9	宿主蛋白殘留	$\leq 10\text{ppm}$	酶聯免疫法
10	無菌檢查	無檢出	中國藥典2020版第四部無菌檢查法 通則 (1101)
11	支原體	無檢出	支原體檢查法(qPCR螢光定量分析)
12	pH	7.5-8.5	中國藥典2020版第四部pH值測定法通則 (0631)

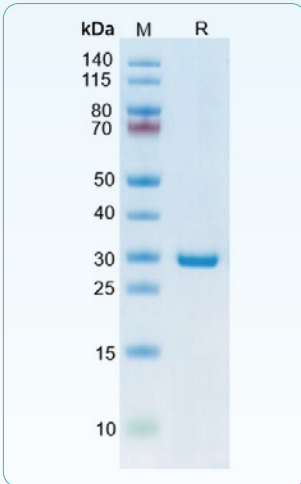
MaxNuclease性能指標

序號	項目	標準
1	產品名稱	MaxNuclease
2	分子量	27.8kDa
3	等電點	6.7
4	最適pH	8.0
5	最適溫度	37°C
6	輔因數	1-10mM MgCl_2
7	儲存緩衝液	20mM Tris-HCl(pH 8.0), 20mM NaCl, 2mM MgCl_2 , 50% Glycerol
8	儲存方式	-20 \pm 5°C保存, 避免反復凍融
9	活性定義	在37°C, pH8.0條件下, 在30min內使 ΔA_{260} 吸收值變化1.0 (相當於完全消化37 μg DNA) 所需的酶量為1個活性單位 (U)

性能資料

純度

Bis-Tris PAGE ($\geq 95\%$)



SEC-HPLC ($\geq 99\%$)

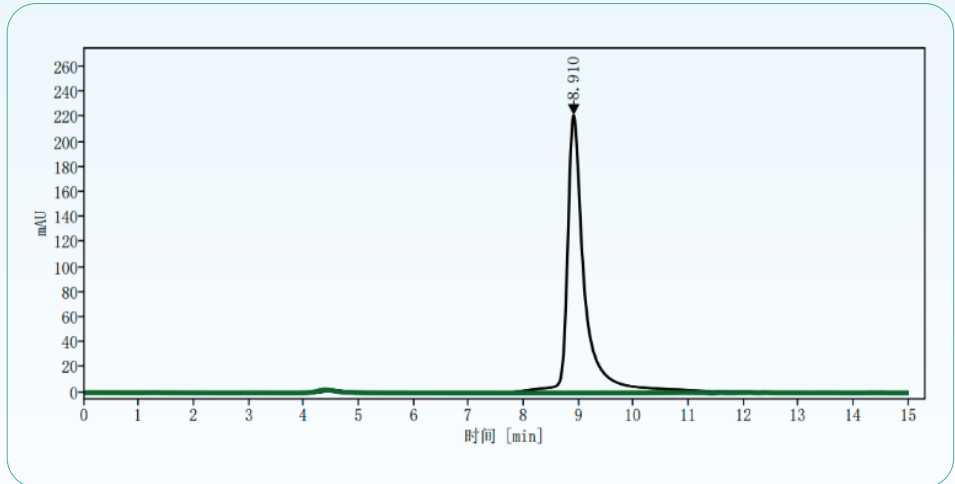
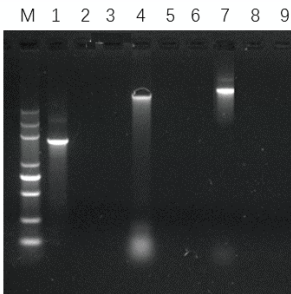


Fig.21 Bis-Tris PAGE和SEC-HPLC檢測MaxNuclease的純度分別為 $\geq 95\%$ 、 $\geq 99\%$ 。

MaxNuclease降解核酸效果



- Lane M: DNA marker
- Lane 1: PCR product
- Lane 2: PCR product+1U MaxNuclease
- Lane 3: PCR product+ 1U competitor
- Lane 4: genomic DNA
- Lane 5: genomic DNA+ 1U MaxNuclease
- Lane 6: genomic DNA+ 1U competitor
- Lane 7: plasmid DNA
- Lane 8: plasmid DNA +1U MaxNuclease
- Lane 9: plasmid DNA +1U competitor

Fig.22 MaxNuclease能有效降解核酸，降解效果與競品相當。

MaxNuclease反應條件

Condition	Optimal*	Effective*
Mg ²⁺	1-2mM	1-10mM
Na ⁺ 、K ⁺	0-100mM	0-300mM
pH	8-10	4-10
溫度	37°C	0-50°C
PO ₄ ³⁻	0-10mM	0-80mM

Optimal is defined as the condition under which MaxNuclease retains > 90% of its activity.
Effective is defined as the condition under which MaxNuclease retains > 15% of its activity.

陽離子對酶活的影響

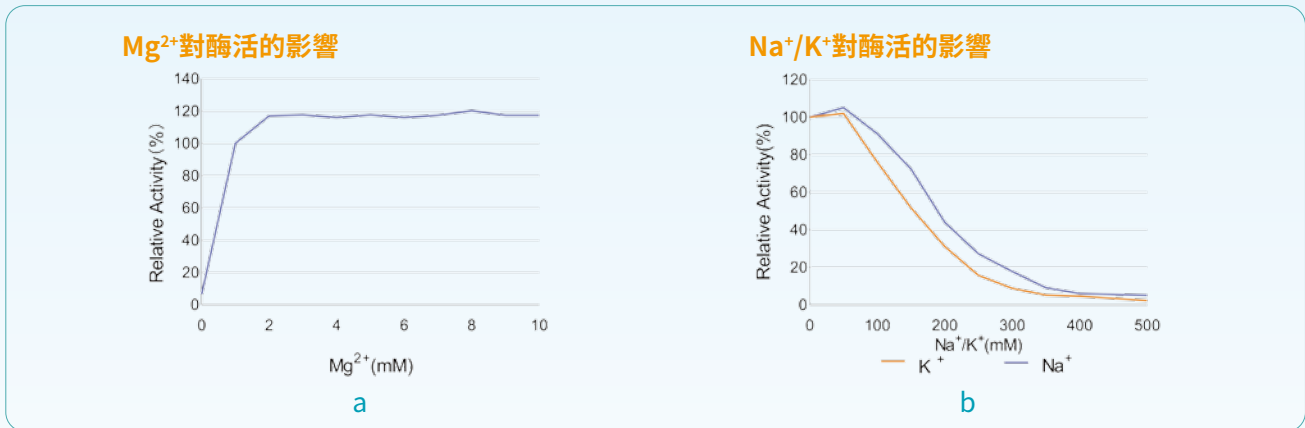


Fig.23 Mg²⁺和Na⁺/K⁺對酶活的影響, 1-2mM的Mg²⁺對MaxNuclease發揮功能是必需的(a), Na⁺/K⁺會抑制MaxNuclease的活性, 濃度大於500mM時, 酶活基本全部喪失(b)。

反應溫度和pH對酶活的影響

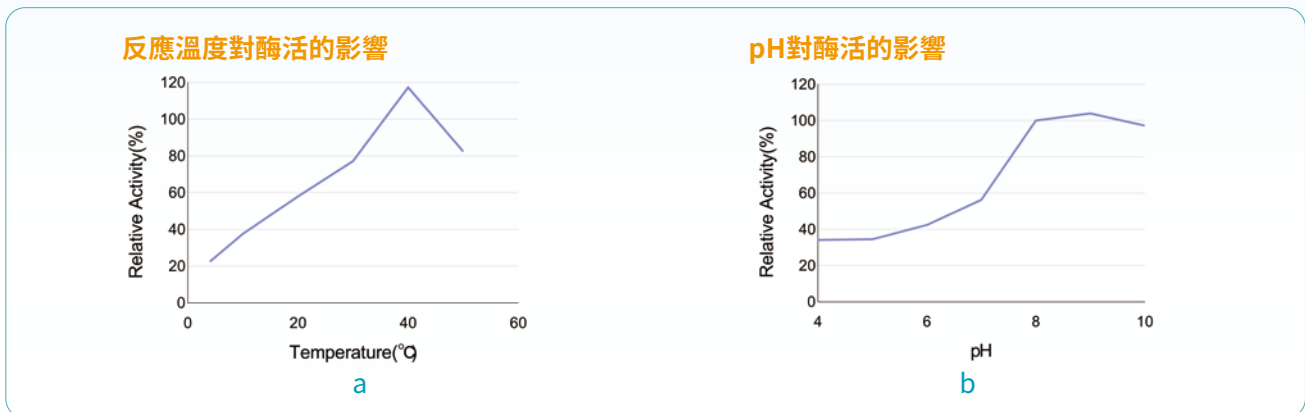


Fig.24 反應溫度和pH對酶活的影響, MaxNuclease最佳反應溫度為37°C(a), 最佳pH範圍為8-10(b)。

常見緩衝液對酶活的影響

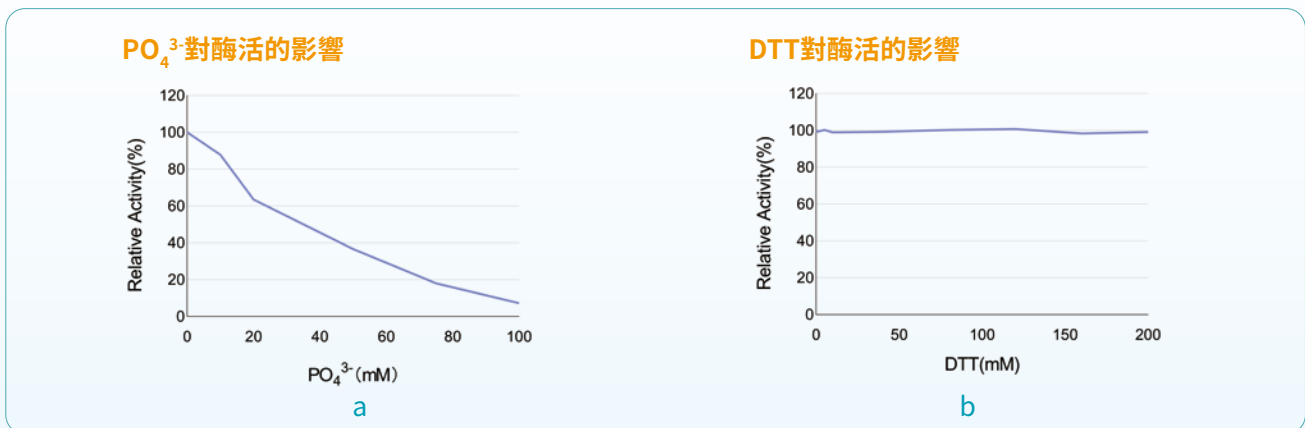


Fig.25 PO₄³⁻和DTT對酶活的影響, 高濃度的PO₄³⁻會對MaxNuclease起到抑制作用, 最佳範圍為0-10mM (a); 0-200mM的DTT對MaxNuclease活性基本無影響(b)。

蛋白沉澱劑 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 對酶活的影響

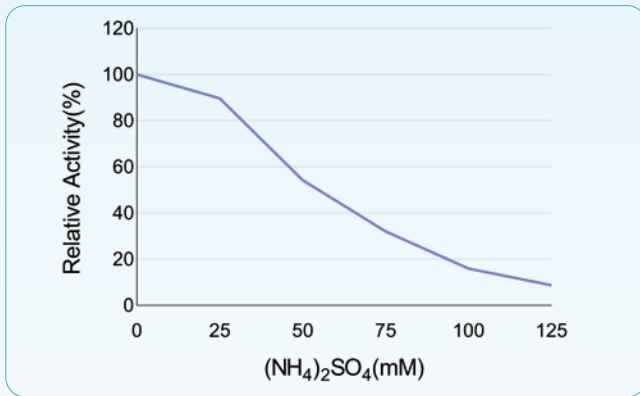


Fig.26 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的濃度越高對MaxNuclease的抑制作用越明顯，當濃度 > 125mM時，會導致MaxNuclease失活。

表面活性劑(Tween 20)對酶活的影響

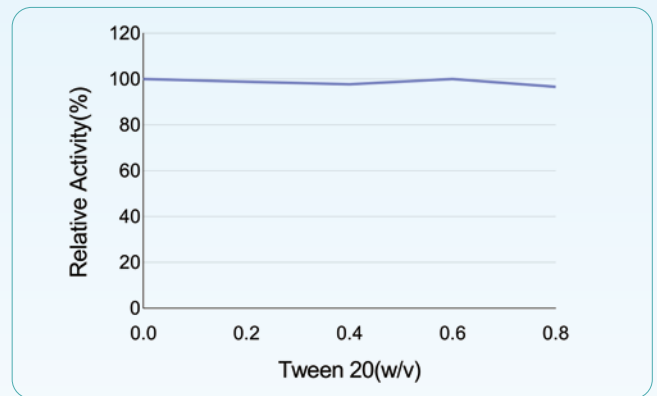
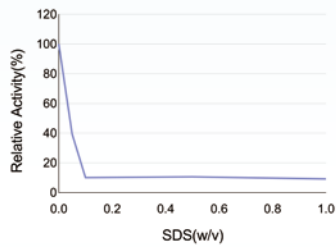


Fig.27 Tween 20濃度在0.8%以內對MaxNuclease基本無影響。

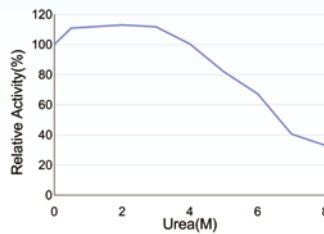
變性劑對酶活的影響

SDS對酶活的影響



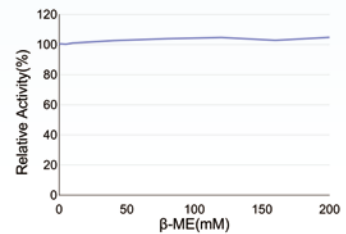
a

尿素對酶活的影響



b

β -巰基乙醇對酶活的影響

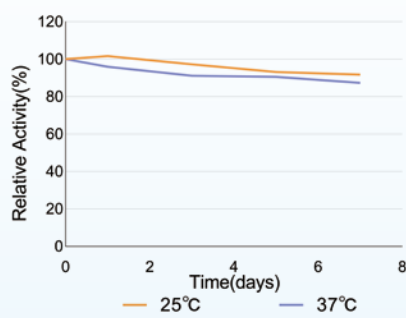


c

Fig.28 SDS、尿素、 β -巰基乙醇對酶活的影響，SDS會嚴重抑制MaxNuclease的活性，0.1%的SDS可抑制超過50%的活力(a)；當尿素濃度超過4M時，MaxNuclease活性會出現明顯降低；低於8M時，MaxNuclease均有活性(b)； β -巰基乙醇濃度在0-200mM對MaxNuclease無明顯影響(c)。

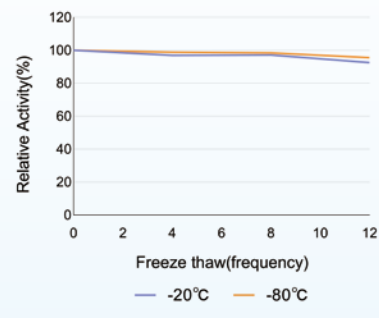
MaxNuclease穩定性測試

25°C/37°C放置7天對酶活的影響



a

-20°C/-80°C反復凍融對酶活的影響



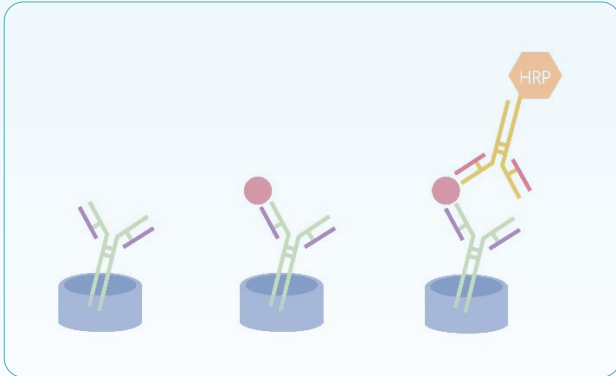
b

Fig.29 MaxNuclease穩定性測試，在25°C/37°C放置7天(a)，-20°C/-80°C反復凍融12次不影響性能(b)。

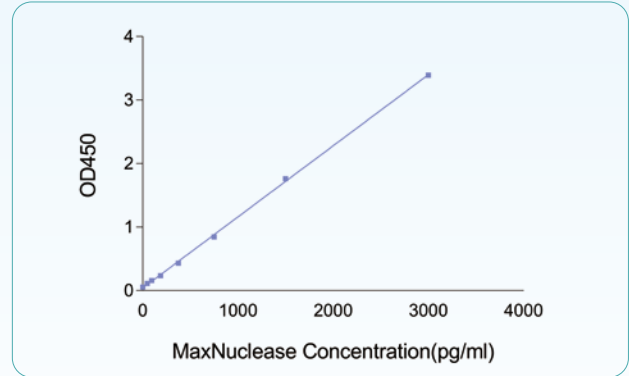
MaxNuclease ELISA Kit

MaxNuclease ELISA Kit可以高靈敏、高特异性檢測和定量分析病毒載體和病毒類疫苗中的全能核酸酶的殘留。檢測範圍為46.88pg/ml-3000.00pg/ml, 靈敏度可達23.44pg/ml。

檢測原理



標準曲線繪製



產品資訊

貨號	產品名稱	規格
NUC-SE101	MaxNuclease全能核酸酶(250U/μl)	50kU/250kU/5MU
GMP-NUC-SE101	MaxNuclease全能核酸酶(250U/μl) (GMP grade)	250kU/5MU
NUC-SE00B	MaxNuclease ELISA Kit	96T

基因治療相關產品 ——AAV9 Titration ELISA Kit

AAV載體因安全性較好、轉染效率高,在基因治療領域廣受青睞。AAV滴度測定是AAV基因治療藥物質控的重要步驟。愷作生物AAV9 Titration ELISA Kit可用於檢測AAV9的總滴度,旨在為AAV9的滴度測定提供準確、可靠的解決方案。

產品特點:

本品相容經典法和快速法,可根據實驗需求選擇

抗體採用重組表達,重複性、一致性好

檢測靈敏度高,低至 1.0×10^7 capsids/ml

與競品相比,線性範圍更寬

抗添加基質干擾能力強

特異性好,不與AAV2/5/8、Denatured AAV9結合

精密度高,高值CV<5%

加樣回收率介於80%-120%

產品資料:

1. 與競品對比,線性範圍更寬

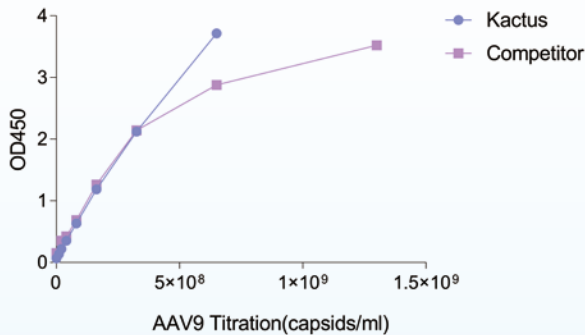
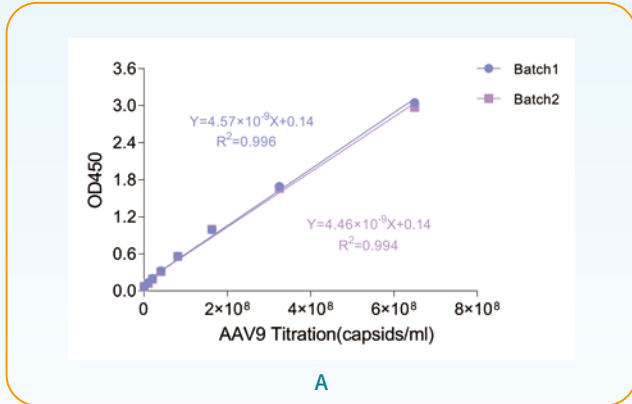


Fig.30 競品對比資料,分別使用本品(經典法)和Competitor(經典法)做標準曲線,結果顯示本品線性範圍更寬。

本品線性範圍: 1.02×10^7 - 6.50×10^8 capsids/ml,
競品線性範圍: 2.03×10^7 - 3.25×10^8 capsids/ml

2. 檢測範圍: $1.02 \times 10^7 - 6.50 \times 10^8$ capsids/ml

經典法



快速法

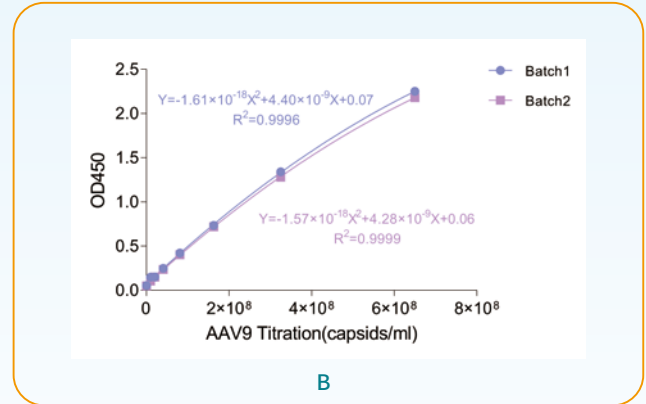


Fig.31 本品可相容經典法和快速法, 經典法為線性擬合(A), 快速法為多項式擬合(B), R^2 均可達到0.99以上。

3. 特異性檢測

AAV9檢測抗體與AAV2/5/8交叉反應

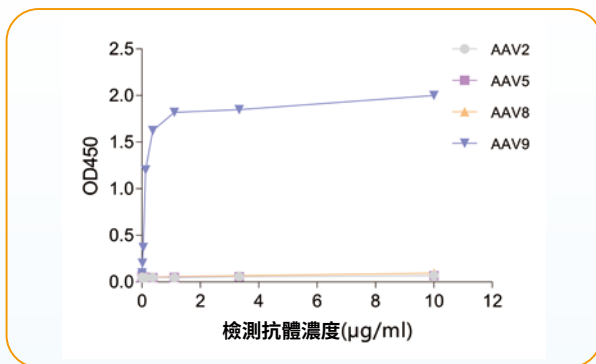


Fig.32 AAV9檢測抗體與AAV2/5/8/9交叉結合檢測, 用不同濃度的AAV9檢測抗體與相同滴度的AAV2/5/8/9交叉結合, 以檢測抗體的濃度為橫坐標, OD450值為縱坐標繪製結合曲線, 結果顯示AAV9檢測抗體只特異性結合AAV9。

AAV9檢測抗體與Denatured AAV9的結合檢測

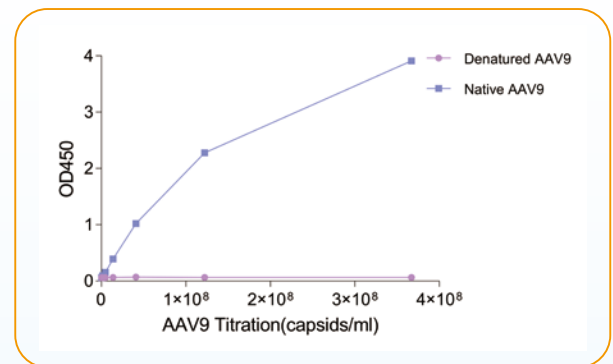


Fig.33 AAV9檢測抗體與Native AAV9/Denatured AAV9交叉結合檢測, 用相同的檢測抗體與不同滴度的Native AAV9/Denatured AAV9交叉結合, 以AAV9滴度為橫坐標, OD450值為縱坐標繪製結合曲線, 結果顯示AAV9檢測抗體只特異性結合Native AAV9。
Denatured AAV9處理方式: 95°C 加熱5分鐘。

4. 加樣回收率檢測

稀釋緩衝液中加樣回收率檢測

樣本名稱	測定滴度1	測定滴度2	測定滴度3	平均測定滴度	回收滴度	加入滴度	回收率
分析樣本1	1.97E+07	1.82E+07	2.05E+07	1.94E+07	9.61E+07	8.13E+07	118.20%
分析樣本2	7.55E+07	7.53E+07	7.58E+07	7.55E+07	7.13E+08	6.50E+08	109.74%
分析樣本3	4.53E+08	4.43E+08	4.26E+08	4.40E+08	4.73E+09	5.20E+09	90.91%
基礎樣本	1.18E+07	1.18E+07	1.17E+07	1.18E+07			

在稀釋緩衝液中檢測三個不同滴度AAV9分析樣本的加樣回收率，結果顯示加樣回收率介於80%-120%，表明本品在稀釋緩衝液中檢測AAV9滴度的準確度高。

HEK293細胞加樣回收率檢測

樣本名稱	測定滴度1	測定滴度2	測定滴度3	平均測定滴度	回收滴度	加入滴度	回收率
分析樣本1	2.13E+07	2.03E+07	2.08E+07	2.08E+07	9.13E+07	8.13E+07	112.35%
分析樣本2	6.61E+07	6.93E+07	6.75E+07	6.76E+07	6.07E+08	6.50E+08	93.31%
分析樣本3	4.32E+08	4.35E+08	4.48E+08	4.38E+08	4.68E+09	5.20E+09	90.07%
基礎樣本	1.41E+07	1.33E+07	1.38E+07	1.37E+07			

在HEK293細胞(含有細胞數2.00E+06/ml)裂解液中檢測三個不同滴度AAV9分析樣本的加樣回收率，結果顯示加樣回收率介於80%-120%，表明本品在HEK293細胞裂解液中檢測AAV9滴度的準確度高，細胞裂解產物並不影響AAV9的檢測。

三批次加樣回收率檢測

樣本名稱	kit批次1	kit批次2	kit批次3	平均測定滴度	回收滴度	加入滴度	回收率
分析樣本1	1.02E+08	1.01E+08	1.03E+08	1.02E+08	1.78E+08	1.63E+08	109.44%
分析樣本2	5.86E+07	5.54E+07	5.97E+07	5.79E+07	9.01E+07	8.13E+07	110.82%
分析樣本3	3.07E+07	3.29E+07	3.14E+07	3.17E+07	3.77E+07	4.06E+07	92.96%
基礎樣本	2.64E+07	2.62E+07	2.44E+07	2.56E+07			

在稀釋緩衝液中用三個不同批次kit檢測三個不同滴度AAV9分析樣本的加樣回收率，結果顯示加樣回收率均介於80%-120%，表明本品的準確度高。

5. 精密度检测

不同樣本精密度檢測

樣本名稱	重複測試資料										AV	SD	CV
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
AAV9樣本1(高滴度)	3.01E+08	3.01E+08	2.96E+08	3.01E+08	3.09E+08	2.91E+08	3.01E+08	2.94E+08	2.99E+08	3.11E+08	3.00E+08	6.13E+06	2.04%
AAV9樣本2(中滴度)	1.09E+08	1.07E+08	1.09E+08	1.08E+08	1.13E+08	1.00E+08	1.12E+08	1.13E+08	1.14E+08	1.18E+08	1.10E+08	4.90E+06	4.43%
AAV9樣本3(低滴度)	3.20E+07	3.40E+07	3.22E+07	3.30E+07	3.47E+07	3.30E+07	3.32E+07	3.35E+07	3.52E+07	3.37E+07	3.35E+07	1.02E+06	3.04%

用本品檢測高中低三種不同滴度的AAV9樣本，每種樣本在同板中重複測試10次，結果顯示每種滴度樣本的CV值都小於5%，表明本品精密度良好。

三批次精密度檢測

樣本名稱		重複測試資料								AV	SD	CV
		1	2	3	4	5	6	7	8			
AAV9樣本1 (高滴度)	kit 批次1	4.29E+08	4.14E+08	4.08E+08	4.11E+08	4.02E+08	3.99E+08	3.90E+08	3.99E+08	4.06E+08	1.19E+07	2.93%
	kit 批次2	4.29E+08	4.17E+08	4.05E+08	4.08E+08	3.99E+08	3.96E+08	3.87E+08	3.99E+08	4.05E+08	1.31E+07	3.25%
	kit 批次3	4.57E+08	4.57E+08	4.42E+08	4.42E+08	4.30E+08	4.33E+08	4.21E+08	4.51E+08	4.42E+08	1.34E+07	3.02%
AAV9樣本2 (中滴度)	kit 批次1	1.11E+08	1.06E+08	1.07E+08	1.05E+08	1.11E+08	1.16E+08	1.05E+08	1.02E+08	1.08E+08	4.38E+06	4.06%
	kit 批次2	1.09E+08	1.13E+08	1.02E+08	1.04E+08	1.03E+08	1.07E+08	1.07E+08	1.06E+08	1.06E+08	3.78E+06	3.56%
	kit 批次3	1.15E+08	1.14E+08	1.13E+08	1.08E+08	1.15E+08	1.16E+08	1.08E+08	1.10E+08	1.13E+08	3.11E+06	2.76%
AAV9樣本3 (低滴度)	kit 批次1	3.02E+07	3.06E+07	3.12E+07	3.14E+07	3.02E+07	3.12E+07	3.02E+07	3.06E+07	3.07E+07	5.29E+05	1.72%
	kit 批次2	2.89E+07	2.95E+07	3.04E+07	2.97E+07	3.12E+07	3.10E+07	3.04E+07	2.76E+07	2.98E+07	1.18E+06	3.96%
	kit 批次3	2.94E+07	2.94E+07	2.97E+07	2.88E+07	2.82E+07	2.94E+07	2.76E+07	3.03E+07	2.91E+07	8.81E+05	3.03%

用三個不同批次的產品檢測高中低三種不同滴度的AAV9樣本，每種樣本在同板中重複測試8次，結果顯示每種滴度樣本的CV值都小於5%，表明本品批間穩定性好。

產品資訊

貨號	產品名稱	規格
AV9-MM00B	AAV9 Titration ELISA Kit	96T

其它酶類產品

TelN Protelomerase

TelN Protelomerase 中文名稱為 TelN 原核端粒酶，克隆自噬菌體 N15，具有切割-連接活性，可用于合成線性閉合mini DNA載體。其在識別位點TelRL (56bp) 切割dsDNA，TelRL位點由中間的回文序列-TelO和兩端14bp的回文序列R3、L3構成 (Fig.34)，並在酶切位點處留下共價封閉的髮夾結構，從而有效地將環狀DNA轉化為有髮夾末端的線性DNA。

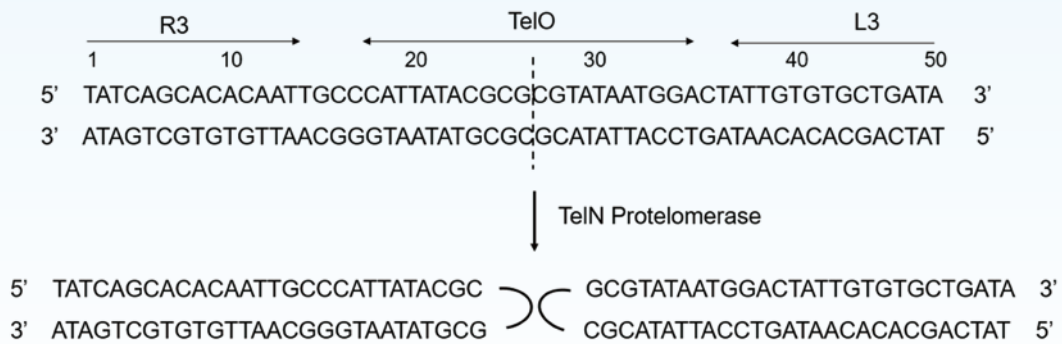


Fig.34 TelRL位點

產品資料

TelN Protelomerase活性與某知名供應商相當

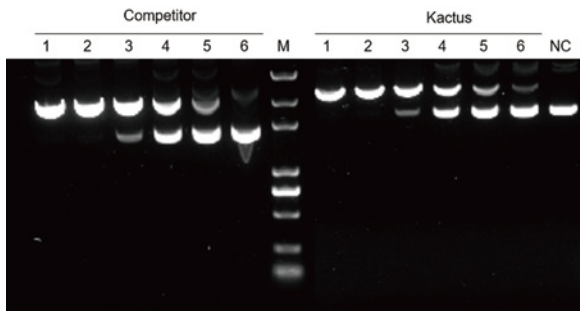


Fig.35 TelN Protelomerase可有效將環狀DNA轉化為有髮夾末端的線性DNA，其活性與某知名供應商相當。在50μl體系中加入323fmol dsDNA和1μl TelN Protelomerase(1-6孔依次2倍梯度稀釋，NC為對照組)，37°C反應30分鐘。

產品資訊

貨號	產品名稱	規格
TLN-BE001	TelN Protelomerase(10U/μl)	10kU/50kU

phi29 DNA Polymerase

phi29 DNA polymerase 是從 *Bacillus subtilis* 噬菌體克隆的DNA 聚合酶, 具有很強的鏈置換活性和連續合成的特性, 常用於在體外等溫擴增。此外, 該酶具有較強的3' →5' 核酸外切酶活性, 其保真性遠高於絕大多數 taq 酶, 確保了DNA合成的高保真性。

注: 在某些應用場景下, 使用此酶會有專利限制。

產品資訊

貨號	產品名稱	規格
PHI-BE101	phi29 DNA Polymerase (10U/μl)	500U/5000U

Exonuclease III & T5 Exonuclease

Exonuclease III和T5 Exonuclease都屬於核酸外切酶。Exonuclease III沿3'→5'方向從平末端、5' 突出端或切口處降解DNA。相反, T5 Exonuclease沿 5'→3'方向降解DNA, 可以從線性或環狀雙鏈DNA的缺口(gap)或缺刻(nick)處開始降解。

產品資料

Exonuclease III& T5 Exonuclease有效降解5' 突出的DNA

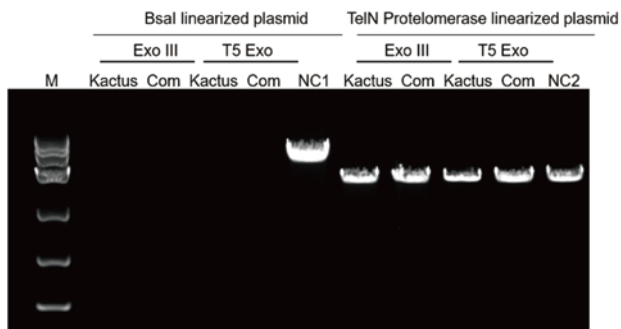


Fig.36 Exonuclease III&T5 Exonuclease有效降解Bsal線性化的雙鏈DNA (Bsal酶切後形成5' 突出末端), 而對TelN Protelomerase線性化的雙鏈DNA無影響(TelN Protelomerase線性化形成帶有髮夾末端的線性DNA)。在20μl反應體系中加入2μg 經Bsal/TelN Protelomerase處理過的雙鏈DNA和1μl Exonuclease III/2μl T5 Exonuclease, 37°C下反應30分鐘。

注: 圖中的Exo III代表Exonuclease III; T5 Exo代表T5 Exonuclease

產品資訊

貨號	產品名稱	規格
EXO-EE101	Exonuclease III (100U/μl)	500U/5000U
T5E-PE101	T5 Exonuclease(10U/μl)	1000U/10kU

RNA 5' Pyrophosphohydrolase (RppH)

RNA 5' Pyrophosphohydrolase (RppH)能從5' 末端三磷酸化的RNA中去除焦磷酸鹽產生5' 單磷酸 RNA。RppH 蛋白又叫 NudH/YgdP, 可以將二腺苷五磷酸 (diadenosine penta-phosphate) 分解成 ADP 和 ATP。

產品資訊

貨號	產品名稱	規格
RPP-EE101	RNA 5' Pyrophosphohydrolase (RppH)(5U/μl)	1000U/5000U

RNase III

RNase III依賴於Mg²⁺, 是雙鏈RNA (double stranded RNA, dsRNA) 特異性核酸外切酶, 可將dsRNA切割為5' - 端磷酸化, 3' - 羥基末端2個碱基游離的18-25bp的小片段干擾RNA (siRNA)。用RNase III降解長片段dsRNA形成siRNA庫能夠有效誘導特異的基因沉默; 此外, 在體外轉錄 (IVT) 過程中產生的副產物dsRNA具有免疫原性, 也可使用RNase III進行去除。

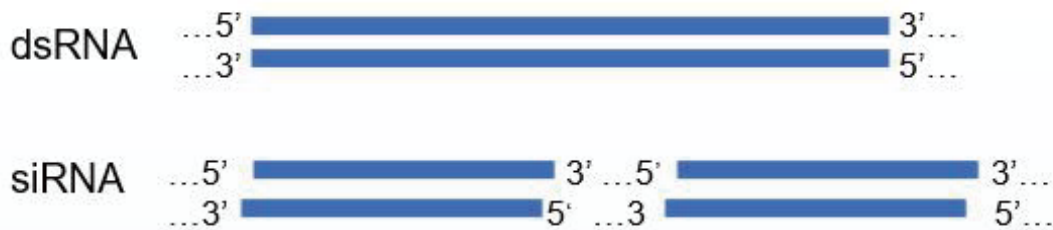


Fig.37 RNase III作用機理

產品資訊

貨號	產品名稱	規格
RNI-EE601	RNase III(4U/μl)	200U/2000U

RNase H

RNase H, 即Ribonuclease H, 中文名為核糖核酸酶H, 是一種核糖核酸內切酶, 可以特異性地水解DNA-RNA 雜合鏈中的RNA。RNase H不能水解單鏈或雙鏈DNA或RNA中的磷酸二酯鍵, 即不能消化單鏈或雙鏈DNA或RNA。

產品資訊

貨號	產品名稱	規格
RPH-EE101	RNase H (5U/μl)	500U/5000U

Antarctic Phosphatase

Antarctic Phosphatase 是一種源自南極微生物的、熱敏感的重組表達純化的磷酸酶, 可非特異性地催化去除DNA、RNA、dNTP、rNTP 5' 或 3' 末端磷酸基團。Antarctic Phosphatase 其應用場景較為廣泛, 如克隆和探針末端標記。在克隆實驗中, 主要是對線性質粒去磷酸化以防止自連。該酶可作用於 5' 突出末端、凹陷端和平末端。

產品資訊

貨號	產品名稱	規格
TAB-AE101	Antarctic Phosphatase(5U/μl)	1000U/5000U

參考文獻

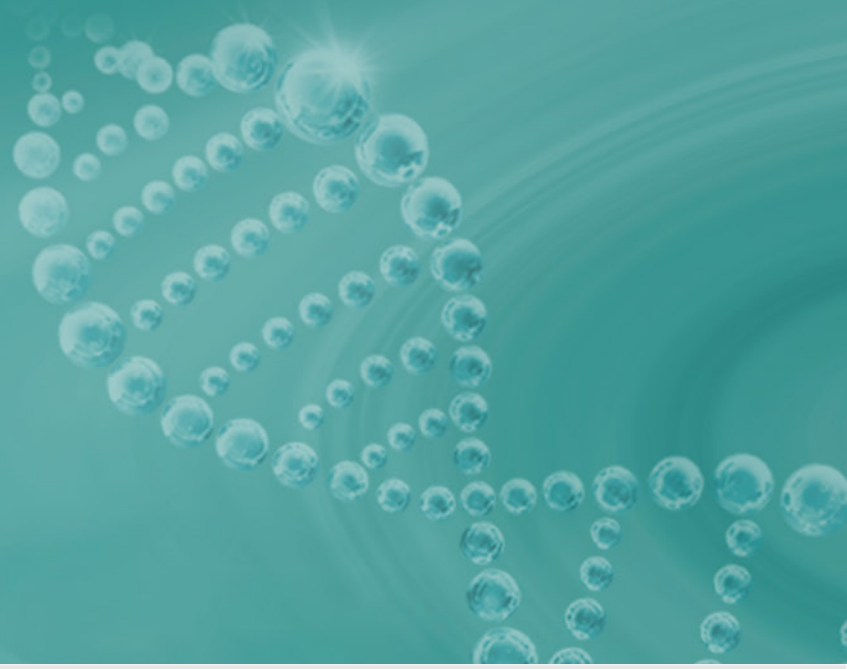
- [1] Chaudhary N , Weissman D , Whitehead K A . mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2021.
- [2] Fabian M , Nils M , Andrea R . Synthetic mRNA capping[J]. Beilstein Journal of Organic Chemistry, 2017, 13:2819-2832.
- [3] Alexander W R , Kowalski P S , Anderson D G . Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells[J]. Nature Communications, 2018, 9(1):2629.
- [4] Chuyun Chen, Huanhuan Wei, Kai Zhang, et.al. A flexible, efficient, and scalable platform to produce circular RNAs as new therapeutics[J]. bioRxiv.

KACTUS

KACTUS - <https://kactusbio.com/>

60 Hickory Drive
Waltham, MA 02451

United States



進階生物科技股份有限公司

台北總公司 02-26959935 免付費專線 0800251302 傳真 02-26958373
經銷商 榮陽長庚區·康寧 02-28200822 www.level.com.tw



進階官網



FB粉絲團