

产品目录号：
N2511
N2515

重组 RNasin® RNA 酶抑制剂简明操作步骤



注意：这是节选操作步骤，详细英文说明书见 <http://www.promega.com/tbs/9pin251/9pin251.html>
本简明操作步骤的电子版在 www.promega.com.cn

来源：表达重组克隆的大肠杆菌。

酶储存液：重组RNasin® RNA酶抑制剂溶于20mM HEPES-KOH (pH 7.6), 50mM KCl, 8mM DTT, 50% (v/v)甘油中。

单位定义：一个活力单位定义为抑制5 ng RNA酶A 50%活力所需要的重组RNasin® RNA抑制剂的量。活力检测的方法是测定其对RNA酶A水解2',3'-环单磷酸胞嘧啶的抑制。请注意查看产品标签上的活力单位浓度。

储存条件：储存于-20°C。避免多次冻融和频繁温度变化。请注意查看产品标签上的过期日期。

使用注意：RNasin® RNA抑制剂在广泛的pH值范围内有活性。冻存样品可能出现浓度梯度，应在融化后混匀。使用前请将充分混合。

表1. 重组RNasin® RNA酶抑制剂的性质

| 性质 | 注释 |
|-------------|----------------------------|
| 作用 | 通过非共价结合使RNA酶失活 |
| 分子量 | 49,847道尔顿 |
| 抑制类型 | 非竞争性 |
| 等电点 | pI 4.7 |
| 活性pH范围 | pH 5.5-9 |
| 与RNA酶A的结合比率 | 1:1 |
| 结合抑制常数 | $K_i = 4 \times 10^{-14}M$ |
| 使用量 | 每微升溶液用1单位抑制剂 |
| 应避免的反应条件 | 高于50°C的温度，尿素，SDS，其它变性剂 |

表2. 重组RNasin® RNA酶抑制剂针对核酸酶的选择性效果

| 抑制 | 不抑制 |
|-----------|--|
| RNase A | RNase T1 |
| RNase B | S1 Nuclease |
| RNase C | RNase from <i>Aspergillus sp.</i> |
| 人胎盘 RNase | RNase H, RNase ONE™ 核酸酶, Taq DNA 聚合酶, ImProm-II™、AMV 或 M-MLV 反转录酶, SP6、T3 或 T7 聚合酶 |

I. 描述

RNasin® RNA 酶抑制剂具有广谱的抑制 RNase 活性的性质，包括抑制中性型(neutral type)真核 RNase (见表 1)。该抑制剂的分子量为 50kDa, 按 1:1 的比例与 RNase 非共价结合发挥抑制作用。RNasin® RNA 酶抑制剂与 RNase (如 RNase A) 结合的 K_i 值大约是 $10^{-14}M$ 。

普洛麦格(北京)生物技术有限公司 电话: 800 810 8133, 010 58256268 网址: www.promega.com; www.promega.com.cn

修改于 03/09

重组 RNasin® RNA 酶抑制剂简明操作步骤



相较之下，抗体的结合常数通常为 10^6 - 10^9 M。除此之外，RNasin® RNA酶抑制剂的动力学反应非常快速，保证了对RNA酶迅速形成复合物合并对其抑制。Promega提供两种不同的抑制剂：Natural RNasin® Ribonuclease Inhibitor（目录号N2111, N2115）和 Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor（目录号N2511, N2515）。两种产品均通过离子交换和亲和层析相结合的纯化方法纯化得到。两种抑制剂都不含DNA外切酶和内切酶活性，也不含RNA酶活性。除有抑制RNA酶的能力之外，RNasin® RNA酶抑制剂还能减少由血管生成素引起的新生血管生成。

重组RNasin® RNA酶抑制剂为用户保证了高纯度和质量的一致性。分离自重组大肠杆菌，N端是一个未被阻断的丝氨酸残基。

注意事项：由于RNA酶能在变性的条件下保持活性，所以应注意避免使已经和RNA酶形成了复合物的RNasin® RNA酶抑制剂失活。为了防止有活性RNA酶被释放出来，反应温度不得高于50°C，不要有高浓度的尿素等变性剂存在。RNasin® RNA酶抑制剂在广泛的pH范围内有活性。如果要稀释并保存更长的时间，请加入DTT（最小浓度为1mM）

II. 常规应用

重组的和天然的RNasin® RNA酶抑制剂在体外转录翻译反应中可相互替换使用，如下所述。要了解更多关于体外转录系统和操作信息，请阅读Riboprobe®体外转录系统操作手册TM016，

www.promega.com/tbs

A. 体外转录 (无标记RNA)

在下面标准的体外转录反应中，RNasin® RNA酶抑制剂的终浓度是1u/μl。通过合适的改变，这个反应可用在多种体外转录实验中。

| | |
|--------------------------------|-------|
| 5X transcription buffer | 20μl |
| DTT, 100mM | 10μl |
| RNasin® Ribonuclease Inhibitor | 100u |
| ATP, GTP, CTP和 UTP, 各2.5mM* | 20μl |
| 在水或TE中的线性质粒 DNA, 2-5μg | 2μl |
| RNA 聚合酶; SP6, T3 或 T7 | 0-50u |
| 无核酸酶的水加至 | 100μl |

37-40°C 孵育60-120 分钟

*4种10mM rNTP储存液按等体积混合

B. 体外转录(³²P标记的RNA探针)

| | |
|--|-------|
| 5X transcription buffer | 4μl |
| DTT, 100mM | 2μl |
| RNasin® Ribonuclease Inhibitor | 20u |
| ATP, GTP和UTP, 各2.5mM † | 4μl |
| CTP, 100μM | 2.4μl |
| 在水或TE中的线性质粒 DNA, 0.2-1.0mg/ml | 1μl |
| [α- ³² P]CTP, 50μCi, 10mCi/ml | 5μl |
| RNA聚合酶, SP6, T3 或 T7 | 1μl |
| 无核酸酶的水加至 | 20μl |

37-40°C孵育60分钟。

†将1体积水和1体积每管10mM ATP, GTP 和 UTP储存液混合。

C. 体外翻译

在标准和耦联的体外翻译系统中加入RNasin® RNA酶抑制剂保证RNA底物得到保护。

在兔网织红细胞中对样品进行体外表达：

| | |
|--|------|
| Rabbit Reticulocyte Lysate | 35μl |
| Nuclease-free water | 7μl |
| RNasin® Ribonuclease Inhibitor | 40u |
| Amino Acid Mixture Minus Methionine, 1mM | 1μl |
| [³⁵ S]methionine, (1,200Ci/mmol) at 10mCi/ml | 4μl |
| 溶于水中的 RNA 模板 | 2μg |
| 终体积 | 50μl |

30°C孵育60分钟。

II. 缓冲液和溶液的组分

5X transcription buffer

| |
|-------------------------|
| 200mM Tris-HCl (pH 7.5) |
| 30mM MgCl ₂ |
| 10mM 亚精胺 |
| 50mM NaCl |

1X TE buffer

| |
|------------------------|
| 10mM Tris-HCl (pH 8.0) |
| 1mM EDTA |