

Native 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9PIN211见
www.promega.com/protocols/

适用产品目录号：N2111 N2115

I. 说明

天然 RNasin® RNA酶抑制剂分子量为50kDa，通过非共价键以1:1的比例结合RNase。可抑制RNase A家族和人胎盘RNase。天然的RNasin® RNA酶抑制剂从人胎盘分离而来，产品中可能含有氨基酸序列稍有不同多种形态抑制剂，N端被阻断。产品经测试，无1型艾滋病病毒和A, B, C型肝炎病毒。

II. 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。

III. 需自备的材料

除Native RNasin® RNA 酶抑制剂以外的所有反应组分。

IV. 操作步骤

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/protocols/

1. 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。

1). 反应体系配制

| 组分 | 体积 |
|--------------------------------|-------|
| 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 | 0-50u |
| 无核酸酶的水加至 | 100μl |

**4种10mM rNTP储存液按等体积混合

2). 反应条件

37-40° C. 孵育60-120 分钟

Native RNasin® RNA 酶抑制剂简明操作步骤

2. 体外转录(³²P标记的RNA探针)

1). 反应体系配制

| 组分 | 体积 |
|--|-------------|
| 5X transcription buffer | 4μl |
| DTT, 100mM | 2μl |
| RNasin® Ribonuclease Inhibitor | 20u |
| ATP, GTP和UTP, 各2.5mM † 4μl | 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 | 5μl |
| RNA聚合酶, SP6, T3 或 T7 | 1μl |
| 无核酸酶的水加至 | 20μl |

†将1体积水和1体积10mM ATP, GTP 和 UTP储存液混合。

2). 反应条件:

37–40° C孵育60分钟。

3. 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。

1). 在兔网织红细胞中对样品进行体外表达:

• 反应体系配制

| 组分 | 体积 |
|---|-------------|
| 兔网织红细胞裂解物 | 35μl |
| 无核酸酶水 | 7μl |
| RNasin® Ribonuclease Inhibitor | 40u |
| 氨基酸混合物, 缺失甲硫氨酸, 1mM | 1μl |
| [³⁵ S]标记的甲硫氨酸 (1,200Ci/mmol) 10mCi/ml | 4μl |
| 溶于水的RNA模板 | 2μg |
| 终体积 | 50μl |

• 反应条件:

30° C孵育60分钟。

2). 在转录翻译偶联的TNT®兔网织红细胞裂解物或者麦胚提取物系统中进行体外表达:

• 反应体系配制

| 组分 | 体积 |
|---|------|
| TNT®兔网织红细胞裂解物或者麦胚提取物 | 25μl |
| TNT®反应缓冲液 | 2μl |
| TNT®T3, T7或SP6 RNA 聚合酶 | 1μl |
| 氨基酸混合物, 缺失甲硫氨酸, 1mM | 1μl |
| [³⁵ S]标记的甲硫氨酸 (1,200Ci/mmol) 10mCi/ml | 4μl |
| RNasin® Ribonuclease Inhibitor 40u/ul | 40u |
| DNA模板 | 1μg |
| 无核酸酶的水加至 | 50μl |

• 反应条件:

30° C孵育60-120 分钟。