

RNasin[®] Plus RNase Inhibitor 简明操作指导

注意：这是节选操作步骤，详细英文说明书见
www.promega.com/protocols/

适用产品目录号：N2611, N2615

I. 说明：

RNasin[®] Plus RNase Inhibitor (RNasin[®] Plus RNA 酶抑制剂) 是一种作为可溶性蛋白在 *E. coli* 中表达的重组哺乳动物 RNase 抑制剂，可以利用离子交换和疏水层析相结合的方法纯化获得，物理纯度 >90%。该蛋白能够抑制真核 RNase(如 RNase A 和 RNase B) 活性，与人胎盘 RNase 抑制剂相似。

RNasin[®] Plus RNase Inhibitor 经过 RT-PCR 检验，能与 AMV、M-MLV 和 ImProm-II™ Reverse Transcriptases 或 Taq 及 *T7* DNA Polymerases 兼容。在 TaqMan[®] 检测中发现 RNasin[®] Plus RNase Inhibitor 也能和定量、实时 RT-PCR 兼容。与人源的这种蛋白相比，该抑制剂具有更高的抗氧化活性。研究表明，来源于人的该蛋白的两个半胱氨酸对氧化非常敏感，并可通过形成二硫键而封闭抑制剂的活性位点。由于天然氨基酸的多样性，RNasin[®] Plus RNase Inhibitor 不能形成封闭位点的二硫键。

此外，这种重组蛋白具有以前从未实现的特性，即在 50℃ 以上能持续抑制 RNase。将 RNasin[®] Plus RNase Inhibitor 和 RNase 的溶液加热再冷却，不会造成 RNase 活性的恢复——即使溶液温度超过 RNasin[®] Plus 蛋白的变性温度。因此，RNasin[®] Plus RNase Inhibitor 能够在加热前、加热中及加热后保护 RNA，即使在 RT-PCR 中第一链 cDNA 合成温度下亦如此。将溶液置于 70℃，15 分钟，没有观察到 RNase 的活性恢复。

酶储存液： RNasin[®] Plus RNase Inhibitor 溶在 20mM HEPES-KOH (pH 7.6), 50mM KCl, 8mM DTT, 50% (v/v) 甘油中。

来源： 表达重组克隆的大肠杆菌细胞。

储存条件： 储存于 -20℃。避免多次冻融和频繁温度变化。请注意查看产品标签上的有效期。

单位定义： 一个活力单位定义为抑制 5ng RNA 酶 A 50% 活力所需要的重组 RNasin[®] Plus RNase Inhibitor 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。

使用注意： RNasin[®] Plus RNase Inhibitor 在广泛的 pH 值范围内有活性。冻存产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。如果在使用变性剂(例如，温度 >50℃，尿素，SDS 等)之前使用 RNasin[®] Plus RNase Inhibitor，在去除变性剂后添加额外的 RNasin[®] Plus RNase Inhibitor，以保护 RNA 免受添加到 RNA 样品中的其他试剂中可能存在的外源 RNase 的作用。

表 1. RNasin® Plus RNase Inhibitor 的特性

| 特性 | 注释 |
|-----------------|------------------|
| 作用 | 通过非共价结合使 RNA 酶失活 |
| 抑制类型 | 非竞争性 |
| 与 RNA 酶 A 的结合比率 | 1:1 |
| 分子量 | 49,905 道尔顿 |
| 等电点 | pI 4.6 |
| 使用量 | 每微升溶液用 1 单位抑制剂 |

表 2. RNasin® Plus RNase Inhibitor 的靶点

| 抑制 | 兼容 |
|-----------------|--|
| RNase A | <i>Taq</i> DNA polymerase |
| RNase B | <i>Tfi</i> DNA polymerase |
| 大鼠肝提取物中的 RNases | AMV and M-MLV reverse transcriptases ImProm-II™ Reverse Transcriptase |

II. 靶向 RNA 和引物变性

下面的方法描述了在组装一个 20-50 μ l 的 RT-PCR 之前的 RNA 模板变性过程。在 RT-PCR 之前进行的靶 RNA 变性可通过降低 RNA 的二级结构而增加 cDNA 的产量。RNasin® Plus RNase Inhibitor 会与本步骤中可能引入的外源性 RNases 结合，并在整个靶标变性过程中始终与它们结合。

1. 将无菌的薄壁反应管置于冰上。在冰上解冻实验所用 RNA，将分装的 RNA 取出后，立即将未使用的部分放回到冰箱。
2. 在冰上将以下组分混合：

| | |
|--|----------------------|
| RNasin® Plus RNase Inhibitor | 1 μ l |
| experimental RNA (typically up to 1 μ g) | X μ l |
| cDNA synthesis primer | Y μ l |
| oligo(dT) | 0.5 μ g/reaction |
| or random hexameric primer | 0.5 μ g/reaction |
| or gene-specific primers | 10–20pmol/reaction |
| 无核酸酶水 | Z μ l |
| 终体积 | 5–10 μ l |
3. 将每管 RNA/ 引物都盖紧。将管子放入预热的 70 $^{\circ}$ C 的加热装置上 5-10 分钟。然后立即在冰水中冷却至少 5 分钟。将每个管子在微型离心机中离心 10 秒，收集液体。保持管子关闭并置于冰上，直到反转录反应混合物已加入。
4. 根据系统或试剂盒说明书或试剂盒说明书的指示，进行偶联或非偶联 RT-PCR。