

Recombinant RNasin[®] Ribonuclease 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：N2511, N2515

I. 说明：

RNasin[®] RNA 酶抑制剂具有广谱的抑制 RNA 酶的特性，包括抑制中性型（neutral type）真核 RNA 酶（1，见表 2）。该抑制剂是分子量为 50kDa 的蛋白，通过以 1:1 的比例与 RNA 酶非共价结合发挥抑制作用。RNasin[®] RNA 酶抑制剂与 RNA 酶（如 RNase A）结合的 K_i 值大约是 $10^{-14}M$ （2-4）。相较之下，抗体的结合常数通常为 10^6 - 10^9M 。除此之外，RNasin[®] RNA 酶抑制剂的动力学反应非常快速，保证了与 RNA 酶迅速形成复合物并对其产生抑制作用。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方法纯化得到。两种抑制剂都不含 DNA 核酸外切酶和核酸内切酶活性，也不含 RNA 酶活性。除有抑制 RNA 酶活性的能力之外，RNasin[®] RNA 酶抑制剂还被证明能够抑制由血管生成素诱导的新生血管生成（5）。

Recombinant RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor（重组 RNasin[®] RNA 酶抑制剂）可为研究人员提供更高级别的纯度和一致性保证。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 酶抑制剂变性。为了防止有活性的 RNA 酶被释放出来，反应温度不得高于 50℃，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（最低浓度为 1mM）。

来源：表达重组克隆的大肠杆菌细胞。

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

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[®] RNA 酶抑制剂的量。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作用。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℃。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。

使用注意：RNasin[®] RNA 酶抑制剂在广泛的 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。使用前请充分混合。

表 1. 重组 RNasin® RNA 酶抑制剂的特性

特性	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 (3)
等电点	pI 4.7
活性 pH 范围	pH 5.5-9 (4)
与 RNA 酶 A 的结合比率	1:1 (3)
结合抑制常数	$K_i = 4 \times 10^{-14}M$ (3,4)
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	- 曲霉属 (<i>Aspergillus sp.</i>) RNase
人胎盘 RNase	RNase H, RNase ONE™ 核糖核酸酶, Taq DNA 聚合酶, ImProm-II™, AMV 或 M-MLV 逆转录酶, SP6、T7 或 T3 RNA 聚合酶

II . 标准操作流程

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的信息, 请参阅 *Riboprobe® In Vitro Transcription Systems* (Riboprobe® 体外转录系统) 操作手册 TM016。

A. 体外转录 (未标记的 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。通过适当调整, 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
溶于水或 TE 中的线性化质粒 DNA, 2-5 μg	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。	

* 将 4 种 10mM rNTP 储液按等体积混合。

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
溶于水或 TE 中的线性化质粒 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 体积水和各 1 体积的 10mM ATP, GTP 和 UTP 储存液混合。

C. 体外翻译

在标准和偶联的体外翻译系统中加入 RNasin[®] RNA 酶抑制剂以保护 RNA 底物。

示例 1: 使用兔网织红细胞裂解物进行体外翻译反应:

Rabbit Reticulocyte Lysate	35μl
RNasin [®] Ribonuclease Inhibitor	40u
Amino Acid Mixture Minus Methionine, 1mM	1μl
[³⁵ S]methionine (1,200Ci/mmol), 10mCi/ml	4μl
溶于水的 RNA 模板	2μg
无核酸酶的水加至终体积	50μl
30°C 孵育 60 分钟。	

示例 2: 使用 TNT[®] 网织红细胞裂解物或小麦胚芽提取物系统进行转录 / 翻译偶联反应:

TNT [®] Rabbit Reticulocyte Lysate or Wheat Germ Extract	25μl
TNT [®] Reaction Buffer	2μl
TNT [®] T3, T7 或 SP6 RNA Polymerase	1μl
Amino Acid Mixture Minus Methionine, 1mM	1μl
[³⁵ S]methionine (1,000Ci/mmol), 10mCi/ml	4μl
RNasin [®] Ribonuclease Inhibitor, 40u/μl	40u
DNA 模板	1μg
无核酸酶的水加至终体积	50μl
30°C 孵育 60-120 分钟。	

III. 缓冲液组成

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

IV . 参考文献

1. Blackburn, P. and Moore, S. (1982) In: The Enzymes, Vol. XV, Part B, Academic Press, New York.
2. Blackburn, P., Wilson, G. and Moore, S. (1977) Ribonuclease inhibitor from human placenta. Purification and properties. J. Biol. Chem. 252, 5904–10.
3. Lee, F.S., Auld, D.S. and Vallee, B.L. (1989) Tryptophan fluorescence as a probe of placental ribonuclease inhibitor binding to angiogenin. Biochemistry 28, 219–24.
4. Shultz, J. and Hurst, R. (2001) Characterization of RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor. Promega Notes 77, 8–11.
5. Shapiro, R. and Vallee, B.L. (1987) Human placental ribonuclease inhibitor abolishes both angiogenic and ribonucleolytic activities of angiogenin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 2238–41.