

产品简介

1 产品所包含的成分

RNasin Ribonuclease Inhibitor (N2111S) 2,500u

2 产品说明

本公司生产的天然的核糖核酸酶抑制剂是从人体胎盘中提取的，在不同生物体中，该蛋白质具有多态性，在氨基酸顺序上会有细微的差别，氨基末端已经被封闭。通过本产品的生产工艺流程所生产的产品，HIV-1, Hepatitis A, B 和 C 的检测均为阴性。

注意事项：现未知有何种测试方法可确保胎盘组织中不携带传染源。所有相关的产品需按照传染源来对待。

产品安全说明：上海普洛麦格公司经过检验并证实核糖核酸酶抑制剂的生产流程具有清除病毒的能力即使原料中有相当大的活性病毒存在。上海普洛麦格公司为此选取了不同批次的最终产品并进行了特异性的病毒检测。由于现在无任何测试方法能确保从人体胎盘提取的产品不会携带传染源。因此上海普洛麦格公司建立了过程控制系统来为我们的顾客提供高度的保证—我们的最终产品基本不含任何传染性病毒。核糖核酸酶抑制剂的纯化过程经独立生物安全测试实验室鉴定，在每一步纯化步骤中均具有去除病毒污染的能力。该测试实验室选取了几个具有代表性的，工业级，高滴度的人体和动物病毒来进行测试。

测试实验结果证明，在高滴度的活性病毒存在下，包括HIV-1和HAV，核糖核酸酶抑制剂的纯化过程将去除这些活性病毒。在用此过程纯化人体胎盘时，无活性病毒检出。

客户在储存和使用该产品时无需将该产品视为污染源而运用通用安全措施。

执行标准号：OAJL5

表1 核糖核酸酶抑制剂的性质

| 性质 | 描述 |
|----------------------------------|--|
| 活性 | 非共价键作用使Rnase失活 |
| 分子量 | 约49KDa |
| 抑制类型 等电点 | 非竞争性抑制 pI 4.7 |
| 活性pH范围 与RnaseA的结合比例 抑制结合常数 | pH5-9 (最适pH7-8) 1: 1 $K_i = 4 \times 10^{-14} M$ |
| 使用量 | 每微升反应液加1单位抑制剂 |
| 反应中应避免 | 温度超过50度，尿素，SDS和其它变性剂 |

表2 核糖核酸酶抑制剂的对不同核酸酶的抑制能力

| 抑制 | 不抑制 |
|----------|---------------------------|
| Rnase A | Rnase T1 |
| Rnase B | 绿豆核酸酶 |
| Rnase C | Rnase from aspergillus sp |
| 人胎盘核糖核酸酶 | Rnase H |
| | Rnase one 核糖核酸酶 |
| | Taq DNA 聚合酶 |
| | AMV 反转录酶 |
| | M-MLV 反转录酶 |
| | SP6, T3, T7RNA 聚合酶 |

4 储存缓冲液

20mM Hepes-KOH (pH 7.6) , 50mM KCl, 8mM DTT , 50% glycerol.

5 单位定义

抑制 5 纳克核糖核酸酶 A 50% 的活性所需的核糖核酸酶抑制剂的量为一单位。活性测试的底物为 CCMP。单位浓度显示在标签上。

6 浓度

40u/ul

7 储存条件

储存于-20℃。避免反复冻融以及频繁的温度变化。

质量控制

- 核糖核酸酶抑制剂活力测定：活性>20u/ul。
- 核糖核酸酶活力分析：无核糖核酸酶活性。
- 核酸外切酶活力分析：游离同位素含量<3%。
- 核酸内切酶活力分析：超螺旋质粒含量>90%。
- 蛋白酶活力分析：无蛋白酶活性。
- SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳：纯度>90%。



Shanghai Promega Biological
Products Ltd.
500 Caobao Road
Shanghai 200233 China
Telephone 86-21-64835136
Fax 86-21-64700176
Internet
<http://www.shpromega.cn>

All Shanghai Promega Products are tested to ensure performance at the given specifications.

Shanghai Promega certifies this product will perform to the stated specifications if stored and handled as recommended.

建议使用方法

RNasin是一种广谱的核糖核酸酶抑制剂，能抑制多种核糖核酸酶包括真核生物的中性核糖核酸酶，分子量约50KDa。它对RNase，例如RNase A是以非共价键结合的方式加以抑制，结合比例为1:1，其Ki值可达到 $4 \times 10^{-14}M$ 。本公司生产的天然RNasin是从人体胎盘中通过离子交换和亲和层析方法所提纯的，无DNA内切酶和外切酶活性以及核糖核酸酶活性存在。RNasin除了能抑制核糖核酸酶活性外，已被证实具有抑制由血管生成素诱导的血管生成能力，能抑制碱性成纤维细胞生长因子活性以及原肌酸钠。此外，RNasin能减少因植入肿瘤细胞而诱发的新生血管的形成，并在小鼠模型中有显著的抑制肿瘤生长的作用。

注意事项：由于核糖核酸酶通常在变性条件下依然保有活性，因此在使用过程中应避免使RNasin变性。为防止已经与RNasin结合的核糖核酸酶被释放，反应温度不能超过50°C，不能使用高浓度的尿素或其它变性剂。RNasin的适用反应pH范围是比较广泛的。

1 使用说明

核糖核酸酶抑制剂适用的pH范围较广但需要至少1mM的DTT存在来维持活性。使用前请混匀以免浓度不均匀。

2 标准应用

核糖核酸酶抑制剂能应用于体外转录和翻译系统，下面将做描述。若想了解更多关于体外转录系统的信息，请索取体外转录系统技术文件#TM016。

A 体外转录（未标记的RNA）

下述标准体外转录反应中RNasin的最终浓度为1u/ul。经适当调整后，该反应可用于多种关于体外转录的实验应用中。

| | |
|--|-------|
| 5X transcription buffer* | 20ul |
| DTT, 100mM | 10ul |
| RNasin® Ribonuclease Inhibitor | 100u |
| ATP, GTP, CTP and UTP, 2.5mM each** | 20ul |
| linearized plasmid DNA, 2–5ug in H ₂ O or TE buffer | 2ul |
| RNA polymerase; SP6, T3 or T7 | 0–50u |
| nuclease-free water to a final volume of | 100ul |

* 5X transcription buffer: 200mM Tris-HCl (pH 7.5)、30mM MgCl₂、10mM spermidine、50mM NaCl。

**由4种10mM rNTP储存液等体积配制。

37–40°C 保温 60–120 分钟。

B 体外转录（32P-标记的RNA探针）

| | |
|--|-------|
| 5X transcription buffer | 4ul |
| DTT, 100mM | 2ul |
| RNasin® Ribonuclease Inhibitor | 20u |
| ATP, GTP and UTP, 2.5mM each | 4ul |
| CTP, 100uM | 2.4ul |
| linearized template DNA, 0.2–1.0mg/ml in H ₂ O or TE buffer | 1ul |
| [³² P]CTP, 50uCi at 10mCi/ml | 5ul |
| RNA polymerase, SP6, T3 or T7 | 1ul |
| nuclease-free water to a final volume of | 20ul |

37–40°C 保温60分钟，将1体积水和各1体积的10mM ATP，GTP和UTP储存液混合配制而成。

C 体外翻译

在体外翻译系统中加入RNasin将有效的保证RNA底物不被降解。

示例1：用兔网织红细胞裂解物系统进行体外翻译

| | |
|--|------|
| Rabbit Reticulocyte Lysate | 35ul |
| nuclease-free water | 7ul |
| RNasin® Ribonuclease Inhibitor | 40u |
| Amino Acid Mixture Minus Methionine, 1mM | 1ul |
| [³⁵ S]methionine, (1,200Ci/mmol) at 10mCi/ml | 4ul |
| RNA template in H ₂ O | 2ug |
| Final volume of | 50ul |

30°C 保温60分钟。

示例2：用TNT®网织红细胞裂解物或麦芽提取物系统进行体外转录和体外翻译的联合实验

| | |
|---|------|
| TNT® Rabbit Reticulocyte Lysate or Wheat Germ Extract | 25ul |
| TNT® Reaction Buffer | 2ul |
| TNT® T3, T7 or SP6 RNA Polymerase | 1ul |
| Amino Acid Mixture Minus Methionine, 1mM | 1ul |
| [³⁵ S]methionine (1,000Ci/mmol) at 10mCi/ml | 4ul |
| RNasin® Ribonuclease Inhibitor, 40u/ul | 40u |
| DNA template | 1ug |
| Nuclease-free water to a final volume of | 50ul |

30°C保温 60–120 分钟。

参考文献

- Blackburn, P. and Moore, S. (1982) In: The Enzymes, Vol. XV, Part B, Academic Press, New York.
- Blackburn, P., Wilson, G. and Moore, S. (1977) Ribonuclease inhibitor from human placenta. Purification and properties. J. Biol. Chem. 252, 5904–10.
- 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.
- Lee, F.S., Shapiro, R. and Vallee, B.L. (1989) Tight-binding inhibition of angiogenin and ribonuclease A by placental ribonuclease inhibitor. Biochemistry 28, 225–30.
- 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.
- Polakowski, I.J. et al. (1993) A ribonuclease inhibitor expresses anti-angiogenic properties and leads to reduced tumor growth in mice. Am. J. Pathol. 143, 507–17.