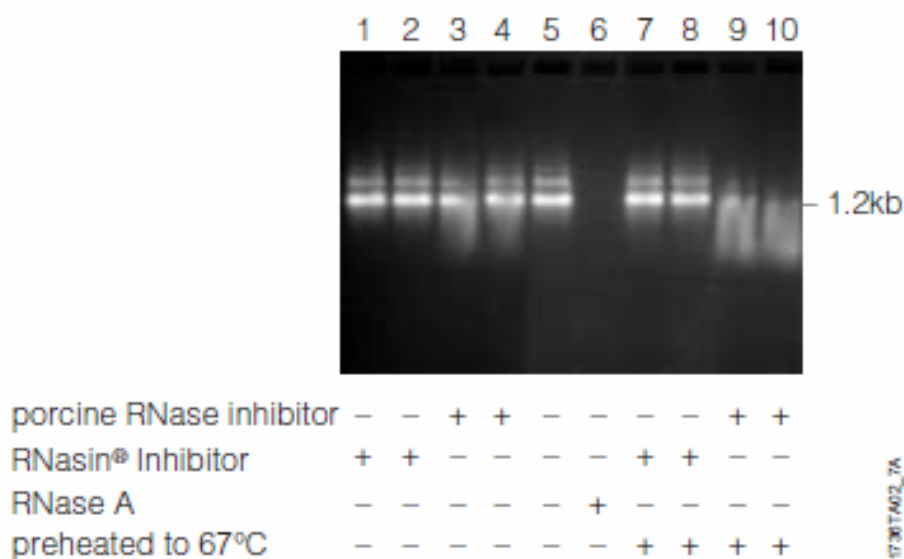


RNasin® Ribonuclease Inhibitors - doskonale narzędzie do wszelkiego typu aplikacji związanych z analizą RNA.

Ponad 6000 artykułów naukowych wymienia RNasin® jako źródło ochrony przed RNazami, od kiedy marka ta została po raz pierwszy wprowadzona przez firmę Promega w 1982 roku, stając się tym samym najbardziej godnym zaufania odczynnikiem chroniącym RNA. Inhibitor ten wykazuje na tyle silne powinowactwo do RNaz, że zabezpiecza wrażliwe molekuly RNA praktycznie w każdych warunkach doświadczalnych. Ten biuletyn opisuje trzy podstawowe kryteria, jakie musi spełniać niezawodny inhibitor RNaz, a także udowadnia, że RNasin® jest dokładnie takim narzędziem jakiego potrzebuje każdy naukowiec przy analizie RNA.

Kryterium 1 – Inhibitor zabezpieczający RNA, nie powinien być zanieczyszczony RNazami.

RNasin® Ribonuclease Inhibitor tworzy stabilny kompleks z RNazą w stosunku 1:1, w rezultacie istnieje ryzyko że podczas oczyszczania pozostanie związany z endogenną nukleazą. Rys. 1. demonstruje, że taka sytuacja ma miejsce w przypadku wielu komercyjnie dostępnych preparatów łóżyskowych inhibitorów RNaz.



Rys. 1. Porównanie aktywności RNaz w obecności Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor i świńskiego inhibitora (elektroforeza w 1,5 % żelu z dodatkiem bromku etydyny). Dwie różne wielkości próbek (100 lub 200 jednostek) każdego inhibitora były inkubowane z 0,1 mg/ml RNA (1,2 kb Kanamycin Positive Control RNA, cat.# C1381) w 37°C przez 60 min. Dodatkowo, niektóre próbki zostały wstępnie ogrzane do 67°C przez 15 minut (aby zdenaturować inhibitory i uwolnić endogenne RNazy) przed dodaniem RNA. Ścieżka 1 i 2 to odpowiednio 100 i 200 jednostek Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor, ścieżka 3 i 4 to odpowiednio 100 i 200 jednostek świńskiego inhibitora RNaz. Ścieżka 5 – RNA bez inhibitorów, ścieżka 6 RNA inkubowane z RNazą A bez dodatku inhibitora. Ścieżka 7 i 8, odpowiednio 100 i 200 jednostek Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor podgrzany do 67°C, ścieżka 9 i 10 odpowiednio 100 i 200 jednostek świńskiego inhibitora RNaz podgrzane do 67°C.

Inhibitory RNaz z rodziny RNasin®

Table 1. Promega RNA Analysis Products That Are Compatible with RNasin® Ribonuclease Inhibitors.

Compatible Application	Product	Cat.#
RT-PCR	Access RT-PCR System ^(a,d)	A1250
	AccessQuick™ RT-PCR System ^(d)	A1702
First-Strand cDNA Synthesis	✓ Reverse Transcription System ^(a,b)	A3500
	✓ ImProm-II™ Reverse Transcription System ^(a,b)	A3800
First- and Second-Strand cDNA Synthesis	Universal RiboClone® cDNA Synthesis System ^(a,b,e)	C4360
	✓ Synthesis System ^(a,b,e)	C4360
Reverse Transcriptases	M-MLV RT	M1701
	M-MLV RT RNase H–	M5301
	M-MLV RT RNase H– Point Mutant	M3681
	AMV RT	M5101
	ImProm-II™ Reverse Transcriptase	A3802
RNA Polymerases	SP6 RNA Polymerase	P1081
	T3 RNA Polymerase	P2083
	T7 RNA Polymerase	P2075
In vitro Transcription Systems	SP6 Riboprobe® System ^(a,b)	P1420
	T3 Riboprobe® System ^(a,b)	P1430
	T7 Riboprobe® System ^(a,b)	P1440
Large-Scale RNA Production	✓ T7 RiboMAX™ Express RNAi System ^(a,b,f)	P1700
	✓ T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System ^(a,b)	P1320
	✓ RiboMAX™ Large Scale RNA Production System—SP6 ^(a,b,g)	P1280
	✓ RiboMAX™ Large Scale RNA Production System—T7 ^(a,b,g,h)	P1300
In vitro Translation	Rabbit Reticulocyte Lysate ^(a,g,i)	L4960
	Wheat Germ Extract	L4380
Coupled Transcription/Translation	TnT® SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System ^(a,g,i,j)	L4600
	TnT® T3 Coupled Reticulocyte Lysate System ^(a,g,i,j)	L4950
	TnT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System ^(a,g,i,j)	L4610
	TnT® SP6 Coupled Wheat Germ Extract System ^(a,g,i,j)	L4130
	TnT® T3 Coupled Wheat Germ Extract System ^(a,g,i,j)	L4120
Coupled Transcription/Translation Master Mix	✓ TnT® SP6 Quick Coupled Transcription/Translation System ^(a,b,g,i,j)	L2080
	✓ TnT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System ^(a,b,g,i,j)	L1170
	✓ TnT® T7 Quick for PCR DNA ^(a,b,i)	L5540

✓ Denotes that system includes Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor either as a separate tube or within the Master Mix.

Właśnie z tego powodu firma Promega Co. rozwinęła technologię oczyszczania preparatów inhibitorów tak, aby oddzielić te związane z nukleazami, a także specyficzny system kontroli jakości do wykrywania obecności RNaz w produkcie. Inhibitor jest podgrzewany powyżej temperatury denaturacji, kompleks RNasin®- nukleaza ulega dysocjacji i w tym punkcie oznaczany jest powrót aktywności RNaz. Ten sposób oczyszczania i kontroli jakości gwarantuje czysty i skuteczny produkt.

Kryterium 2 – Inhibitor RNaz musi być użyteczny w wielu aplikacjach.

Inhibitory RNaz muszą być stabilne w wielu różnych warunkach chemicznych charakterystycznych dla procedur związanych z analizą RNA, dodatkowo ich aktywność nie powinna zaburzać, powszechnie występujących podczas tych analiz, procesów biologii molekularnej. RNasin® był (z pozytywnym wynikiem) obszernie testowany pod względem kompatybilności z wielorakimi technikami analizy RNA (tabela nr 1), włączając w to mikromacierze, ilościowy, Real Time RT-PCR.

1 2 3 4 5 6



Rys.2 Ochrona przed RNazami w temperaturze 70°C.

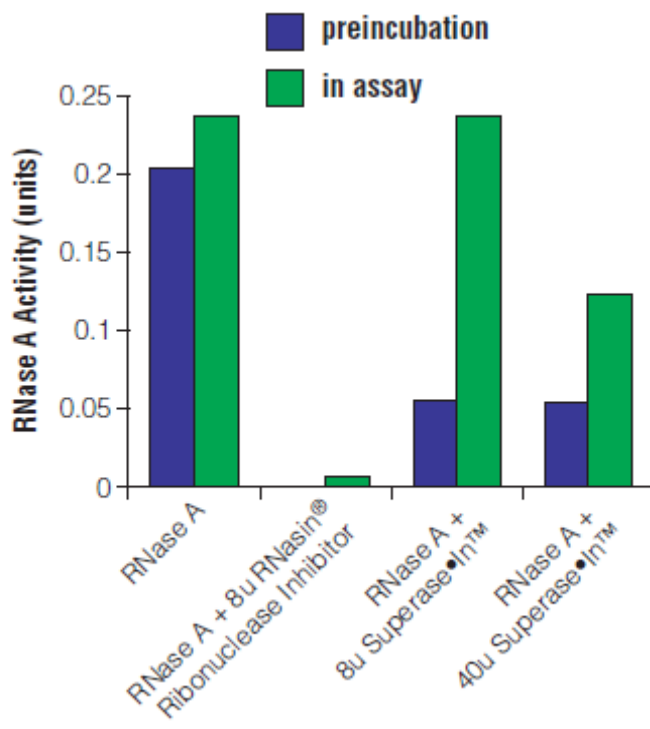
Osobne próbówki z RNasin® Plus i RNazą (ścieżka 1,3 i 5) zostały podgrzane do 70°C. przez 15 min. Ścieżka 2,4,6 RNasin® Plus i RNaza zostały zmieszane i podgrzane do 70°C. przez 15 min. Do każdej próbówki zostało dodane w różnych ilościach Luciferase Control RNA (cat.# L4561): 1µg (ścieżka 1 i 2), 100 ng (ścieżka 3 i 4), 10 ng (ścieżka 5 i 6). Reakcja była dalej prowadzona w 37°C (ścieżka od 3 do 6) przez jedną godzinę lub bezpośrednio przeprowadzono RT-PCR (ścieżka 1 i 2). Na ścieżce 1 i 2 użyto 40 jednostek RNasin® Plus i 20 ng RNazy A. Na ścieżkach 3-6 użyto 400 jednostek RNasin® Plus i 1,25µg ekstraktu białkowego szczurzej wątroby rozpuszczonego w wodzie do końcowego stężenia 0,5µg



Reakcja odwrotnej transkrypcji jest procesem krytycznym w wielu metodach analizy RNA, często prowadzonym w temperaturach powyżej 37°C typowych dla M-MLV RT lub 42°C dla AMV RT. Promega wychodząc naprzeciw potrzebom tych aplikacji oferuje RNasin® Plus Ribonuclease Inhibitors, który zachowuje pełną aktywność w temperaturach nawet do 70°C (Rys. 2)

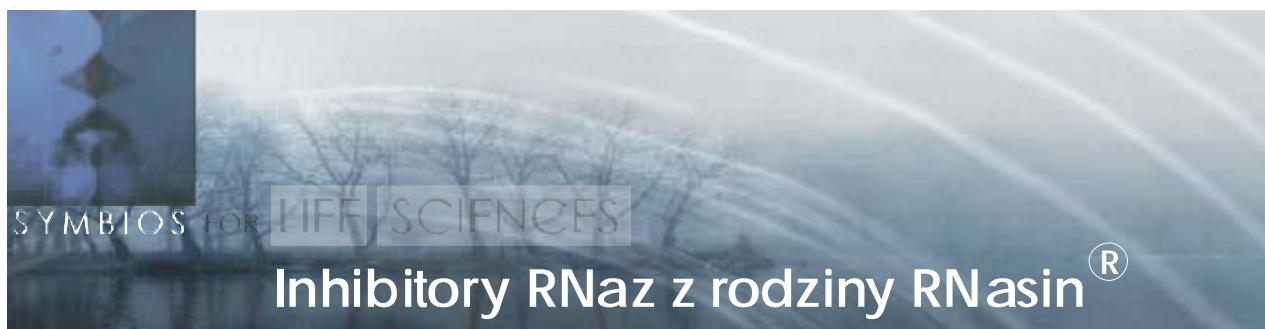
Kryterium 3 – Inhibitor RNaz musi działać natychmiast.

Wszyscy producenci i naukowcy dążą do stworzenia warunków, przeprowadzanych procesów biologii molekularnej, wolnych od RNaz, projektując metody oczyszczania, które eliminowałyby nukleazy. Jednakże, enzymy te mogą pojawić się w środowisku reakcji z niespodziewanych źródeł, dlatego reakcja inhibitora musi być natychmiastowa bez wyraźnego opóźnienia pomiędzy rozpoczęciem aktywności RNazy a jej inhibicją. Inhibitory RNasin® wykazują ekstremalnie wysokie powinowactwo do RNaz, stała szybkości reakcji wynosi $K=4 \times 10^{-14} M$, tym sposobem zahamowanie działania nukleazy następuje momentalnie. Inhibitory z niższym powinowactwem, nie mogą działać tak szybko w szczególności w odniesieniu do śladowych ilości RNaz (Rys. 3).



Rys. 3. Porównanie pomiędzy RNasin a konkurencyjnym inhibitorem podczas „preinkubacji” i w warunkach reakcji. Całkowite RNA drożdżowe było inkubowane w obecności 5ng Razy A przez 15 min w 37°C w 0,5 ml mieszaniny reakcyjnej zawierającej 50 mM MOPS i 5 mM MgCl₂ (pH 6,5). Inhibitory były obecne bądź nie – jak wskazuje wykres. Po inkubacji do próbek zostało dodane 0,5 ml 10%TCA, aby zatrzymać reakcję i precypitować duże cząsteczki RNA.

3102M410_0A



Grupa produktów RNasin® obejmuje 3 produkty:

- **RNasin® Ribonuclease Inhibitors Natural (N2111, N2115)**

- **Recombinant human RNasin® Ribonuclease Inhibitor (N2511, N2515)**

Są to ludzkie inhibitory rybonukleaz: Natural RNasin® Ribonuclease Inhibitor (human placenta) and Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (recombinant E. coli). Oba produkty są uzyskiwane poprzez oczyszczanie przy użyciu kombinacji chromatografii powinowactwa i jonowymiennej. Oba także mają szerokie spektrum blokujących właściwości, włączając w to inhibicję eukariotycznych RNaz neutralnego typu. (tab. 2)

- **RNasin® Plus RNase Inhibitor New Protein for High Temperature RNase Inhibition (N2611, N2615)**

RNasin® Plus RNase Inhibitor jest rekombinowanym ssaczym inhibitorem RNaz, który jest ekspymowany jako rozpuszczalne białko w *E. coli* i oczyszczany z użyciem łączonej chromatografii jonowymiennej i oddziaływań hydrofobowych. Produkt zapewnia wyższą wytrzymałość na oksydację niż RNasin® poprzez brak tendencji do formowania mostków disiarczkowych i chroni RNA podczas ekspozycji na wysokie temperatury reakcji RT

Table 1. Effect of Natural and Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitors on Selected Nucleases and Polymerases.

Inhibits	Does Not Inhibit
RNase A	RNase T1
RNase B	S1 Nuclease
RNase C	RNase from <i>Aspergillus</i>
human placental RNase	RNase H
angiogenin	RNase ONE™ Ribonuclease
	Taq DNA Polymerase
	AMV or M-MLV Reverse Transcriptase
	SP6, T7, T3 RNA Polymerase

Product	Size	Cat.#
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor ^(a,b)	2,500u	N2511
	10,000u	N2515
RNasin® Plus RNase Inhibitor ^(c)	2,500u	N2611
	10,000u	N2615

For Laboratory Use.