

Thermostable RNase H

产品编号	产品名称	包装
R7090FT	Thermostable RNase H	50U
R7090S	Thermostable RNase H	250U
R7090M	Thermostable RNase H	1000U
R7090L	Thermostable RNase H	5000U

产品简介:

- 碧云天生产的Thermostable RNase H, 即耐热RNase H, 是一种在较高温度(65°C以上)时仍然保持活性的核糖核酸内切酶(endoribonuclease)。Thermostable RNase H可以选择性识别并酶切RNA:DNA杂合双链中的RNA的磷酸二酯键, 同时杂合双链中的DNA会保持完整。Thermostable RNase H不会降解单链或双链的RNA或DNA。
- Thermostable RNase H在65°C以上温度时仍具有很高的酶活性, 其在70°C时的半衰期可达几个小时, 在高达95°C时的半衰期仍可达30分钟左右。该酶的耐高温特性使得异源双链RNA:DNA杂交分子具有更高的特异性, 并在较高温度下更特异性地降解杂合双链中的RNA。Thermostable RNase H具有与常见的*E. coli* RNase H具有类似的酶学性质, 但*E. coli* RNase H在高于55°C时即失活。
- Thermostable RNase H与*E. coli* RNase H的热稳定性比较请参考图1。

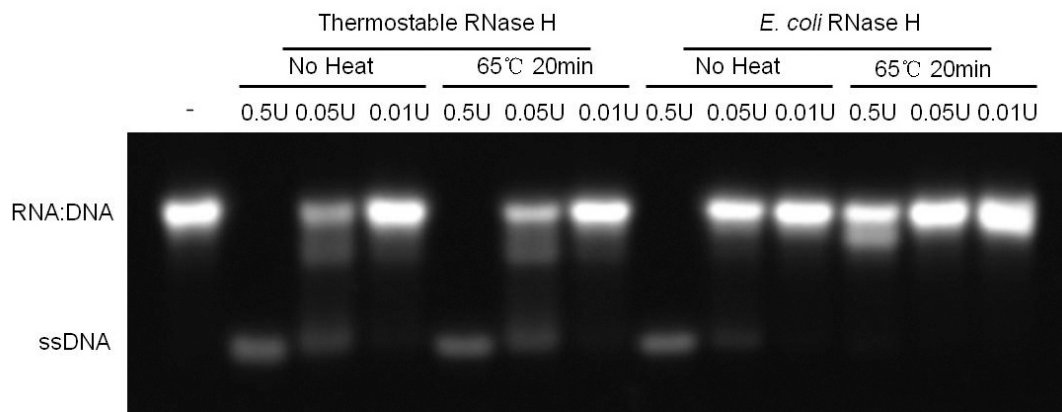


图1. 碧云天生产的R7090 Thermostable RNase H与*E. coli* RNase H的热稳定性比较。在20 μ l反应体系中加入图中指定量的Thermostable RNase H或*E. coli* RNase H, 在65°C孵育20min后, Thermostable RNase H和*E. coli* RNase H分别按照其标准的反应条件(Thermostable RNase H 50°C孵育20min; *E. coli* RNase H 37°C孵育20min)进行RNA:DNA杂交链的酶切反应, 反应完毕后立即冰浴3-5分钟并加入1 μ l 0.5M EDTA终止反应。取出5 μ l反应液, 加入1 μ l 6 \times DNA Loading Buffer, 然后进行15%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(冰浴条件下180V电泳45min; 之后用NA-Red (D0128NA-Red (EB升级换代产品, 2000X))室温染色15min, 即可拍照观察结果)。如图所示, *E. coli* RNase H在65°C时失去活性, 而Thermostable RNase H在65°C时仍保持活性。热稳定性比较反应体系(20 μ l): Thermostable RNase H: 50mM Tris-HCl (pH 8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM DTT, 400ng RNA:DNA杂合双链以及不同量的Thermostable RNase H (包括未经热处理和在65°C孵育20min热处理), 50°C孵育20min; *E. coli* RNase H: 20mM Tris-HCl (pH 7.8), 40mM KCl, 8mM MgCl₂, 1mM DTT, 400ng RNA:DNA杂合双链以及不同量的*E. coli* RNase H (包括未经热处理和在65°C孵育20min热处理), 37°C孵育20min。

- 碧云天生产的Thermostable RNase H催化降解RNA:DNA杂合双链中的RNA链的效果请参考图2:

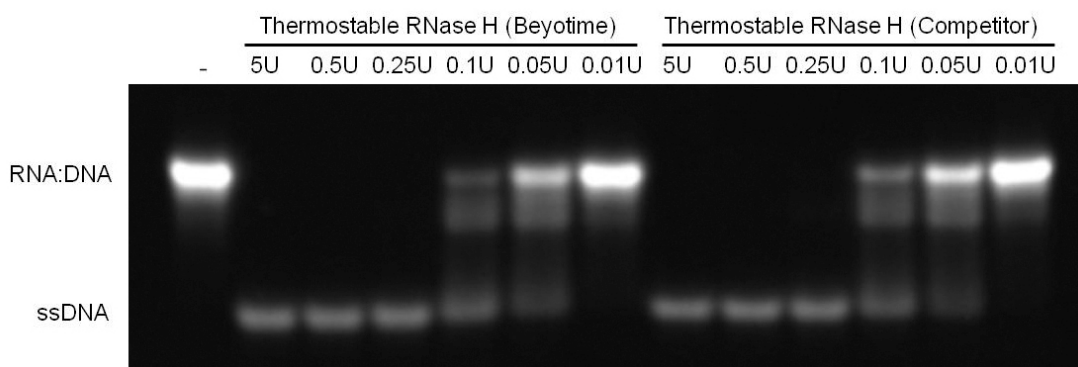


图2. 碧云天生产的R7090 Thermostable RNase H和竞争公司的同类产品的效果比较图。使用本产品或N公司(Competitor)的Thermostable RNase H, 在20 μ l反应体系中加入图中指定量的本产品或国外N公司的Thermostable RNase H, 50 $^{\circ}$ C孵育20min进行反应, 反应完毕后立即冰浴3-5分钟并加入1 μ l 0.5M EDTA以终止反应。取出5 μ l反应液, 加入1 μ l 6 \times DNA Loading Buffer, 然后进行15%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(冰浴条件下180V电泳45min; 之后用NA-Red (D0128 NA-Red (EB升级换代产品, 2000X))室温染色15min, 即可拍照观察结果)。如图所示, 本产品与N公司的产品相比, 具有类似的催化效果。RNA:DNA杂合双链反应体系(20 μ l): 50mM Tris-HCl (pH 8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM DTT, 400ng RNA:DNA杂合双链以及不同量的Thermostable RNase H, 50 $^{\circ}$ C孵育20min。

- **用途:** 高严谨度的RNA结构图谱的描绘和位点特异性RNA切割; 与oligo (dT)杂交的mRNA的poly (A)尾的酶切去除; cDNA合成后去除mRNA; 用于等温扩增实验; 用于和特定DNA序列杂交后酶切去除特定的RNA序列, 例如rRNA的去除等。
- **来源:** 大肠杆菌表达的重组蛋白。
- **活性定义:** One unit is defined as the amount of enzyme required to produce 1 nmol of ribonucleotides from 40 pmol of a fluorescently labeled 25 base pair RNA:DNA hybrid in a total reaction volume of 50 μ l in 20 minutes at 50 $^{\circ}$ C。
- **纯度:** 纯度大于95%, 不含DNA内切酶和外切酶, 不含其它核糖核酸酶。
- **酶储存液:** 50mM Tris-HCl (pH7.5), 100mM NaCl, 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 0.1% Triton[®] X-100, 50% (v/v) Glycerol。
- **10XReaction Buffer:** 500mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25 $^{\circ}$ C), 750mM KCl, 30mM MgCl₂, 100mM DTT。
- **失活或抑制:** 加入适量蛋白酶K消化或加入5%体积的0.5M EDTA pH8.0。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
R7090FT-1	Thermostable RNase H (5U/ μ l)	10 μ l
R7090FT-2	10X RNaseH Reaction Buffer	30 μ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
R7090S-1	Thermostable RNase H (5U/ μ l)	50 μ l
R7090S-2	10X RNaseH Reaction Buffer	150 μ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
R7090M-1	Thermostable RNase H (5U/ μ l)	200 μ l
R7090M-2	10X RNaseH Reaction Buffer	500 μ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
R7090L-1	Thermostable RNase H (5U/ μ l)	1ml
R7090L-2	10X RNaseH Reaction Buffer	2ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20 $^{\circ}$ C保存, 至少一年有效。

注意事项:

- 本产品的最佳反应温度高于65 $^{\circ}$ C, 在95 $^{\circ}$ C时仍具有活性, 其在65 $^{\circ}$ C时的活性是在37 $^{\circ}$ C时的3-4倍。
- 本产品在使用说明中建议的反应温度是50 $^{\circ}$ C, 在实际实验操作中可以根据需要酌情通过提高反应温度提高其酶活性。
- 本产品的反应缓冲液中包含MgCl₂, 当Thermostable RNase H在高温时应用于RNA/DNA杂合链或者RNA样品时, 建议适当限制反应时间和温度, 以减少金属介导的单链RNA降解。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. RNA/DNA 杂合双链的退火。

将单链RNA和DNA等摩尔数混合, 推荐的终浓度为20 μ M, 90 $^{\circ}$ C孵育1min, 然后通过梯度降温至25 $^{\circ}$ C退火形成RNA:DNA杂合双链。推荐使用碧云天生产的R0051Annealing Buffer for RNA oligos (5X), 并按照该产品的使用说明进行退火反应。退火后的双链如果不立即用于后续的翻译, 推荐在-80 $^{\circ}$ C保存。

2. **反应体系的设置。**对于RNA:DNA杂合双链中的RNA链的降解，参考下表在冰浴中配制如下反应体系。

Reagent	Volume	Final
DEPC-treated Water	(17-x) μ l	-
RNA:DNA hybrid	x μ l	0.1 μ g/ μ l or less
10X RNase H Reaction Buffer	2 μ l	1X
Thermostable RNase H (5U/ μ l)	1 μ l	0.25U/ μ l
Total Volume	20 μ l	-

注意：

- 由于涉及RNA操作，需要严格按照RNA操作的规范进行，避免RNase污染，相关试剂和耗材需要经过DEPC处理去除RNase或者确保是RNase free的。
 - 如果同时进行多个反应，可以把上表中除RNA:DNA杂合双链之外的所有溶液和酶提前混合，然后再分装到各反应管。
 - RNA:DNA杂合双链的用量可以是2 μ g或者更少。通常上述反应体系中的杂合双链的量不超过2 μ g，可以确保酶切充分。
3. **酶切反应：50°C孵育20min。**
如果发现效果欠佳，可以根据杂合双链的稳定性尝试将反应温度提高至65°C或更高温度(65°C时的酶活性约是50°C时的3倍)，也可以考虑适当延长反应时间。对于去除总RNA的复杂RNA体系中的特定RNA的反应体系，酶切反应的温度可以适当摸索，例如适当提高酶切的温度，以确保更高的酶切特异性。
4. **终止反应：反应结束后加入蛋白酶K或1 μ l 0.5M EDTA pH8.0，终止反应。**

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
D7089	RNase H	100U
R7090S	Thermostable RNase H	250U
R7090M	Thermostable RNase H	1000U
R7090L	Thermostable RNase H	5000U

Version 2020.09.6