

Ribonuklease A

aus Rinderpankreas; RNase A

Artikel-Nr. A2760

Beschreibung

Molekulargewicht:	~13700 g/mol
CAS-Nr.:	[9001-99-4]
HS-Nr.:	35079090
EINECS:	2326466
E.C.:	3.1.27.5
Aussehen:	weißes Lyophilisat; salzfrei
Gehalt (RNase A):	min. 95 %
Aktivität:	70 U/mg (Kunitz) Einheiten-Definition: Die Menge an Enzym, die bei 25°C und pH 5,0 die Hydrolyse von RNA mit einer Rate bewirkt, bei der K (Geschwindigkeits-konstante) der Einheit (Kunitz-Einheit) gleicht.
pH-Optimum:	7,0 - 7,5
Isoelektrische Punkt:	pH 9,45
Stammlösung:	1 - 10 mg/ml in 10 mM Tris · HCl, pH 7,5; 15 mM NaCl oder in 10 mM Tris · HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8,0 (TE-Puffer) (bzw. siehe Entfernung DNase-Aktivität)
empfohlene Arbeitskonzentration:	10 µg/ml (Entfernung von RNA aus Plasmid-Präparationen; 1 Std., RT) 100 ng/ml (Herstellen von "blunt ends" doppelsträngiger cDNA)
Stabilität (+4°C, lyophilisiert):	mehrere Jahre (trocken gelagert)
Stabilität (-20°C, in Lösung):	mehrere Jahre
Stabilität (+4°C, in Lösung):	mehrere Wochen
empfohlene Lagerung:	-20°C

Hinweis

Ribonuklease A ist eine Endoribonuklease, die spezifisch einzelsträngige RNA 3' zu Pyrimidinresten (Cytosin, Uracil) verdaut. Sie erzeugt dadurch Pyrimidin-3'-phosphate oder Oligonukleotide mit endständigen Pyrimidin-3'-phosphaten. Sie wird zur Reinigung von RNA-freier DNA, zur Entfernung von nichthybridisierten Regionen von RNA:DNA-Hybriden oder als Molekulargewichtsmarker eingesetzt. Das Enzym wird durch Diethylpyrocarbonat (DEPC), Guanidiniumsalzen (4 M GuaSCN), β -Mercaptoethanol, Schwermetallionen, Vanadylribonukleosid-Komplexe, RNase-Inhibitor aus menschlicher Plazenta und kompetitiv durch DNA gehemmt. Dabei ist der Effekt durch denaturierte DNA größer als durch native Nukleinsäuren. Nichtsdestotrotz, RNase A ist unter sehr vielen Reaktionsbedingungen sehr aktiv und schwer zu inaktivieren. Bei niedrigen Salzkonzentrationen (bis 100 mM NaCl) schneidet RNase A einzel- und doppelsträngige RNA und die RNA in RNA:DNA-Hybriden. Unter hohen Salzkonzentrationen (>300 mM NaCl) wird nur einzelsträngige RNA geschnitten. Soll das Enzym aus Reaktionsansätzen beseitigt werden, ist der Einsatz von Proteinase K und mehreren Phenolextraktionen erforderlich.

RNase A aggregiert beim Lyophilisieren und während der Lagerung oder beim Aufkochen bei neutralen pH-Werten. Es besitzt außerdem eine Affinität zu Glasoberflächen, die beim Hantieren beachtet werden muß.

Entfernung der DNase-Aktivität: Da RNase A hitzestabil ist, kann die Aktivität von den generell hitzelabilen DNasen durch Aufkochen zerstört werden (5). RNase A kann in einer Konzentration von 10 mg/ml in 0,01 M Natriumacetat (pH 5,2) gelöst werden. Erhitzen Sie für 15 Minuten auf 100°C im Wasserbad. Das Wasserbad wird abgeschaltet, damit die RNase A langsam auf Raumtemperatur abkühlen kann. Anschließend wird durch Zugabe von dem 0,1fachen Volumen von 1 M Tris-Cl (pH 7,4) wird der pH-Wert eingestellt. Nach dem Aliquotieren wird das Produkt bei -20°C gelagert.

Achtung: RNase präzipitiert, wenn konzentrierte Lösungen bei neutralem pH-Wert auf 100°C erhitzt werden! Außerdem sollte bei der Hitze-Inaktivierung von DNasen in RNase A -Lösungen immer bedacht werden, dass die in der Literatur beschriebene Prozedur (5) möglicherweise nicht den gewünschten Erfolg hat und vielmehr das Risiko birgt, dass RNase A ausfällt und so einen Teil ihrer Aktivität einbüßt. Für Anwendungen, die absolute DNase-Freiheit erfordern, empfehlen wir deshalb unser **Produkt A3832, RNase A (DNase-frei)**.

Anwendung und Literatur

- (1) Enzymatische Manipulation von DNA und RNA. (Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (eds.) (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*. Supplement 8 Seite 3.13.1; Greene Publishing & Wiley-Interscience, New York).
- (2) Entfernung von RNA aus Plasmid-Präparationen. (Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition Seite 1.51. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.)
- (3) Minipreps von Plasmid-DNA. (Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (eds.) (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*. Supplement 24 Seite 1.6.6; Greene Publishing & Wiley-Interscience, New York).
- (4) InSitu-Hybridisierung zellulärer RNA (Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (eds.) (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*. Supplement 7 Seite 14.3.8; Greene Publishing & Wiley-Interscience, New York).
- (5) Herstellung von DNase-freier RNase. (Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition Seite A4.39. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.)