

RNase HII

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|--------|-----------|------|
| R7089S | RNase HII | 250U |
| R7089M | RNase HII | 1KU |
| R7089L | RNase HII | 5KU |

产品简介:

- 碧云天生产的RNase HII, 即Ribonuclease HII, 中文名为核糖核酸酶HII, 也称核糖核酸酶H2 (RNase H2), 是由碧云天自主研发的PerfectProtein™技术平台表达、纯化获得的一种基因为大肠杆菌来源的重组核糖核酸内切酶。RNase HII能够催化双链DNA分子内部嵌入的单个核糖核苷酸或核糖核苷酸链的5'端磷酸二酯键的断裂, 并产生一个5'端磷酸基团和一个3'端羟基。同时, RNase HII对单链RNA以及单链RNA和单链DNA杂合双链中的RNA的切割活性极低, 对dsDNA、ssDNA无切割活性[1]; 此外, RNase HII还可沿着冈崎片段的RNA部分在多个位点进行缺刻(Nick)切割。
- 与RNase HI相比, RNase HII可识别双链DNA分子中的单个核糖核苷酸并进行切割, 而RNase HI不能识别双链DNA中的单个核糖核苷酸; 同时, RNase HII可降解冈崎片段, 而RNase HI无此活性[2]。



图1. 碧云天生产的RNase HII工作原理图。

- 碧云天生产的RNase HII对嵌入单个核糖核苷酸的dsDNA的切割效果请参考图2。

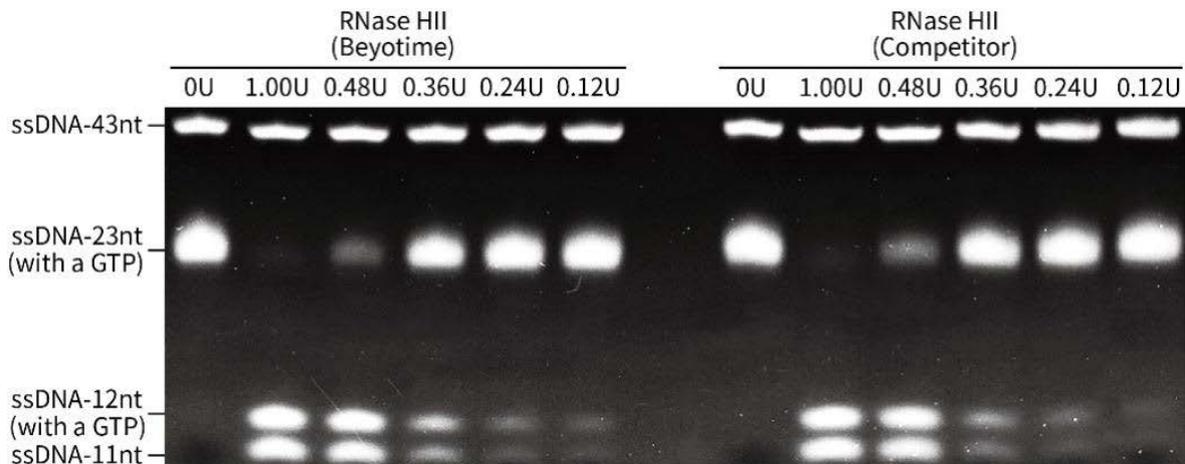


图2. 碧云天生产的RNase HII (R7089)对嵌入单个核糖核苷酸的dsDNA的切割效果图。使用本产品或N公司(Competitor)的RNase HII, 在25 μ l反应体系(20mM Tris-HCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 10mM KCl, 2mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, pH8.8 @25°C)中, 加入50pmol的嵌入单个核糖核苷酸的双链DNA, 以及图中指定量的本产品或N公司(Competitor)的RNase HII, 37°C孵育30分钟进行反应, 反应完毕后立即冰浴3-5分钟, 并取出5 μ l反应产物, 加入1 μ l DNA上样缓冲液(6X) (D0071), 然后进行15%变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳(180V电泳45分钟), 随后用NA-Red (EB升级换代产品, 2000X) (D0128/D0130)室温染色7分钟, 在紫外灯下观察实验结果。如图所示, 本产品与N公司的产品相比, 对嵌入单个核糖核苷酸的dsDNA具有基本一致的催化切割效果。dsDNA with a ribonucleotide (也称嵌入单个核糖核苷酸的双链DNA)是使用Annealing Buffer for DNA Oligos (5X) (D0251), 并按照该产品说明书推荐的反应程序体系, 把5'-CTCTTCAGCTCTATAGAAACCCACGCAAAGCCCTCAGCATTGG-3'和5'-GGGCTTTGCGTG(ribo)GGTTTCTATAG-3'这两条寡核苷酸链进行退火反应得到的产物, 并以此退火产物为底物, 进行嵌入单个核糖核苷酸的双链DNA分子的切割。不同的实验条件下获得的实际检测效果可能会略有不同, 图中效果仅供参考。

- 用途:** 对掺有核糖核苷酸的聚合酶产物进行缺刻(Nick)切割; 与T7核酸内切酶I一同使用, 可在掺入核糖核苷酸的位点处切割产生双链断裂; 降解冈崎片段或其它RNA-DNA嵌合链与DNA形成的双链中的RNA部分; 区分异种同源基因; SNP检测和稀有等位基因检测; 除去杂交到poly(dT)上的mRNA poly(A); 在cDNA第二链合成时去除mRNA。
- 来源:** 纯化自携带编码大肠杆菌RNase HII核糖核酸内切酶基因的*E.coli*重组菌株。

- **分子量:** 约为20kDa (单体)。
- **活性定义:** One unit is defined as the amount of enzyme required to yield a fluorescence signal consistent with the nicking of 100 picomol of synthetic double-stranded DNA substrate containing a single ribonucleotide near the quencher of a fluorophore/quencher pair in 30 minutes at 37°C in 1X Buffer.
- **纯度:** 不含除RNase HII之外其它种类的核糖核酸内切酶, 不含外切酶。
- **酶储存溶液:** 20mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM DTT, 1mM EDTA, 50% (v/v) glycerol, pH8.8 @25°C。
- **10X Reaction Buffer:** 200mM Tris-HCl, 100mM (NH₄)₂SO₄, 100mM KCl, 20mM MgSO₄, 1% Triton X-100, pH8.8 @25°C。
- **失活:** 不能进行热失活; 与0.1% SDS一起孵育可使RNase HII充分失活。

包装清单:

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|----------|---------------------|-------|
| R7089S-1 | RNase HII (5U/μl) | 50μl |
| R7089S-2 | 10X Reaction Buffer | 300μl |
| — | 说明书 | 1份 |

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|----------|---------------------|-------|
| R7089M-1 | RNase HII (5U/μl) | 200μl |
| R7089M-2 | 10X Reaction Buffer | 1.2ml |
| — | 说明书 | 1份 |

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|----------|---------------------|-----|
| R7089L-1 | RNase HII (5U/μl) | 1ml |
| R7089L-2 | 10X Reaction Buffer | 6ml |
| — | 说明书 | 1份 |

保存条件:

-20°C保存, 两年有效。4°C或室温保存, 至少一周有效。

注意事项:

- 与RNase H相比, RNase HII对RNA/DNA杂交链中RNA的酶切活性较低。
- RNase HII处理冈崎片段时, 优先在RNA/DNA序列交界处的核糖核苷酸处产生5'缺刻。
- 相比与RNA/DNA杂交链或冈崎片段, RNase HII更倾向于切割含有单个核糖核苷酸的双链DNA分子。
- 用于依赖于RNase HII的PCR时(rhPCR), 需要使用3'端带封闭基团的DNA引物。
- RNase HII在50-75°C之间均有活性, 其用量可根据不同的应用进行适当调节。
- RNase HII与绝大多数的PCR, LAMP等缓冲体系兼容。
- RNase HII在Mg²⁺浓度为1-6mM之间的缓冲体系中均可发挥活性。
- RNase HII极其耐热, 95°C 15分钟活性无明显降低, 不能进行热失活; 反应结束后加入0.1% SDS或DNA Loading Buffer (D0071) 可使其充分失活。

使用说明:

1. 双链DNA中单个核糖核苷酸的缺刻切割或冈崎片段中与DNA相邻的核糖核苷酸5'端的切割。

- a. 参考下表在冰上配制如下反应体系(50μl体系)。

| Reagent | Volume | Final Concentration |
|-----------------------------|---------------|---------------------|
| dsDNA with a ribonucleotide | xμl (100pmol) | 2pmol/μl |
| 10X Reaction Buffer | 5μl | 1X |
| RNase HII (5U/μl) | 1μl | 0.1U/μl |
| Nuclease-Free Water (ST876) | (44-x)μl | - |
| Total Volume | 50μl | - |

注: 为获得最好的底物切割效果, 建议尝试多种RNase HII的加入量, 摸索最优酶切反应体系。

- b. 按照上表设置好反应体系后, 适当轻轻混匀反应体系, 随后低速离心以使粘附在管壁上的液体聚集于管底。
c. 反应条件: 37°C孵育30分钟。

注: 反应时间可以根据实际情况适当调节和优化, 以确保获得更好的酶切效果。

- d. 终止反应: 反应完成后, 向反应体系中加入终浓度为0.1% SDS可使其充分失活。
e. 8M尿素变性PAGE电泳检测含单个核苷酸的双链DNA切割效果, 或进行后续实验。

2. RNase HII与T7 Endonuclease I (D7080)同时使用, 在双链DNA核糖核苷酸位点处切割产生双链断裂。

- a. 参考下表在冰上配制如下反应体系(50μl体系)。

| Reagent | Volume | Final Concentration |
|----------------------------------|---------------------|---------------------|
| dsDNA with a ribonucleotide | x μ l (100pmol) | 2pmol/ μ l |
| 10X Reaction Buffer | 5 μ l | 1X |
| RNase HII (5U/ μ l) | 1 μ l | 0.1U/ μ l |
| T7 Endonuclease I (10U/ μ l) | 2 μ l | 0.4U/ μ l |
| Nuclease-Free Water (ST876) | (42-x) μ l | - |
| Total Volume | 50 μ l | - |

- b. 按照上表设置好反应体系后，适当轻轻混匀反应体系，随后低速离心以使粘附在管壁上的液体聚集于管底。
c. 反应条件：37°C孵育15-30分钟。
注：反应时间可根据实际情况适当调节和优化，以确保获得更好的酶切效果。
d. 终止反应：反应完成后，向反应体系中加入终浓度为0.1% SDS可使其充分失活。
e. 8M尿素变性PAGE电泳检测双链DNA切割效果，或进行后续实验。

3. RNase HII-dependent PCR (rhPCR), 即核糖核酸酶HII依赖性PCR:

rhPCR是一种依赖于RNase HII，基于其对含有单个核糖核苷酸的双链DNA分子的识别与切割而设计的PCR扩增反应，常被应用于基因表达分析，选择性剪接，SNP基因分型等方面。在rhPCR中，引物的3'端附近被设计含有单个核糖核苷酸，且3'端带有阻断分子，阻止了产物的延伸和扩增。带阻断引物的扩增依赖于引物与互补靶序列杂交期间RNase HII对其的切割活性。rhPCR处于变性程序时，反应体系中的引物和模板以游离形式存在，此时引物不会被RNase HII酶切割；反应进入退火程序后，引物会与特定模板互补配对结合形成含有单个核糖核苷酸的双链DNA，且由于引物3'端带有阻断分子，阻止了反应的延伸与扩增；同时，反应体系中存在的RNase HII会对引物的单个核糖核苷酸的5'端进行切割，移除阻断分子，释放引物3'-OH，使得DNA聚合酶从引物中延伸出来进行PCR的扩增(图3) [3]。PCR反应的循环继续这个过程。

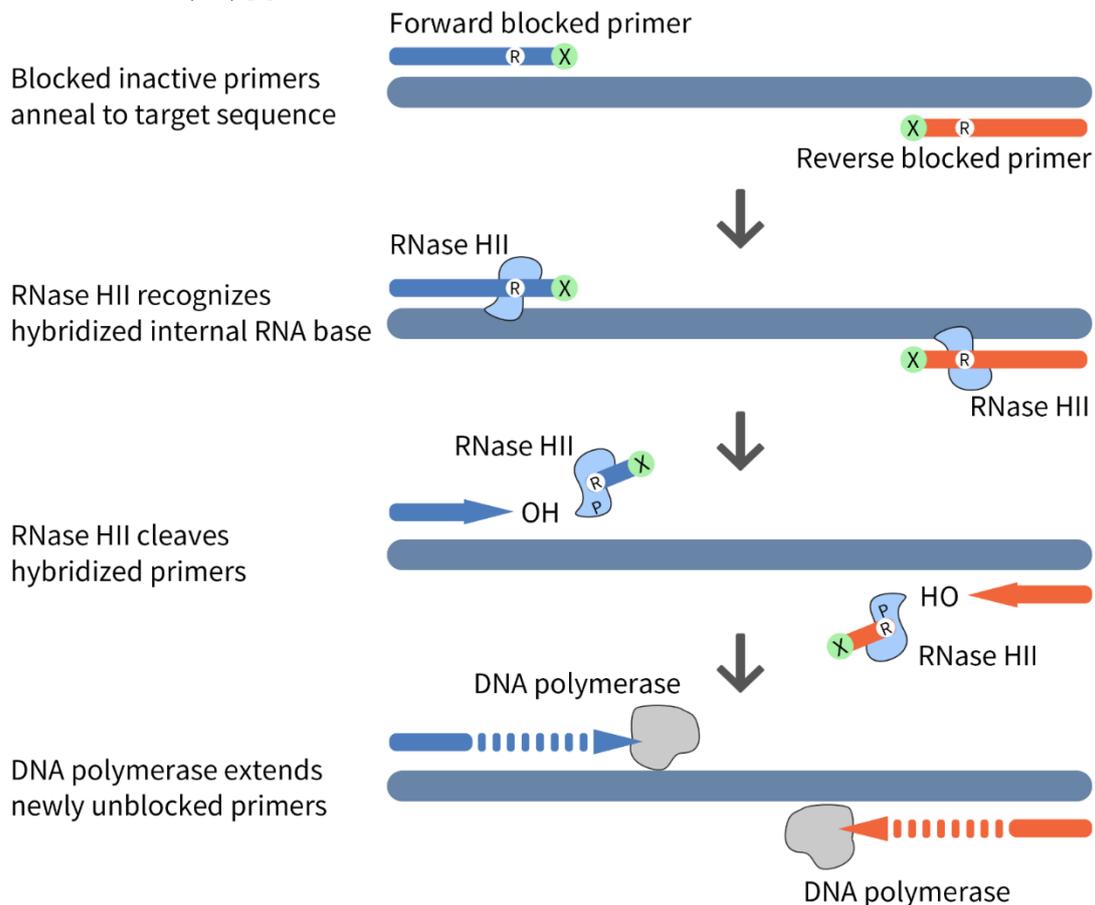


图 3. rhPCR (RNase HII-dependent PCR)工作原理示意图。

- a. 引物设计。rhPCR的引物需设计成不能被DNA聚合酶进行延伸，且在3'末端附近含有单个核糖核苷酸。因此rhPCR的引物在设计时须符合以下三个要求：
a) 5'端长度，GC含量和T_m与常规PCR一致，以保证后续在被RNase HII切割后延伸的正常进行。
b) 单个核糖核苷酸，为RNase HII提供切割位点。
c) 3'端单个核糖核苷酸后为4个或5个核苷酸长度的延伸，再加上一个不可延伸的阻断分子，如双脱氧核糖核苷酸、丙二醇或其它封闭基团，以阻止DNA聚合酶的延伸，除非阻断分子被RNase HII酶切后移除。
b. 参考下表在冰上配制如下反应体系(50 μ l体系)。

| Reagent | Volume | Final Concentration |
|---|-------------|---------------------|
| 10X BeyoTaq Buffer (with Mg ²⁺) | 5µl | 1X |
| dNTP (2.5mM each) (D7371) | 4µl | 0.2mM each |
| Template DNA | xµl | 10pg-1µg*/50µl |
| Primer Mixture (10mM each) | 4µl | 0.8µM |
| RNase HII (5U/µl) | 1µl | 0.1U/µl |
| BeyoTaq DNA Polymerase (5U/µl) (D7218/D7219) | 0.25µl | 0.025U/µl |
| Nuclease-Free Water (ST876) | (35.75-x)µl | - |
| Total Volume | 50µl | - |

*对于不同类型的模板在50µl反应体积中推荐用量如下：哺乳动物基因组DNA：0.1-1µg；大肠杆菌基因组DNA：10-100ng；质粒DNA：0.1-10ng。过多的模板DNA容易导致非特异性的PCR产物。

- 使用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀，室温离心数秒，使液体积聚于管底。
- 如果所使用的PCR仪有热盖则省略本步骤。如果PCR仪没有热盖，则在管内滴入一滴矿物油(ST275)。
- 各设置好的PCR反应管置于PCR仪上，准备进行PCR反应。
- rhPCR反应参数的设置可以参考如下示例：

STEP1(起始变性): 94°C 3min

STEP2(变性): 94°C 30sec

STEP3(退火): 55-60°C 30sec

STEP4(延伸): 72°C 2min

STEP5(循环): Go To STEP2 for 30 cycles

STEP6(最终延伸): 72°C 10min

STEP7(临时保存): 4°C forever

注1: PCR反应的设置需根据模板、引物、PCR产物的长度和GC含量等条件的不同设定不同的PCR反应条件包括温度、时间和循环数等。

注2: STEP4(延伸)的时间设置需根据PCR产物的长度进行设置，通常每kb产物的延伸时间为1.5分钟。例如PCR产物的长度为1kb，则延伸时间可以设置为1.5分钟，PCR产物的长度为2kb，则延伸时间可以设置为3分钟，以此类推。

注3: 对于初次进行的PCR，为尽量确保可以扩增出预期的PCR产物，可以把循环数设置为35。对于需进行半定量或定量的PCR反应循环数一定要进行适当优化，使PCR反应没有达到平台期。

常见问题：

1. RNase HII不能进行热灭活。如何使RNase HII失活？

向反应体系中加入终浓度为0.1%的SDS，可使RNase HII充分失活。

2. RNase HII切割核糖核苷酸的哪一侧？

RNase HII在掺入到DNA双链中的单个核糖核苷酸的5'端进行切割，生成3'羟基端和5'磷酸端产物。

参考文献：

- Itaya M. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990. 87(21):8587-91.
- Rydberg B, Game J. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002. 99(26):16654-9.
- Dobosy JR, Rose SD, Beltz KR. BMC Biotechnol. 2011. 11:80.

相关产品：

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|--------|--------------------------------|-------|
| ST576 | RNase A (10mg/ml, DNase free) | 1ml |
| ST577 | RNase A (100mg/ml, DNase free) | 0.5ml |
| ST578 | RNase A (10mg/ml) | 1ml |
| ST579 | RNase A (100mg/ml) | 0.5ml |
| D7089 | RNase H | 100U |
| R7088S | RNase H | 250U |
| R7088M | RNase H | 1000U |
| R7088L | RNase H | 5000U |
| R7089S | RNase HII | 250U |
| R7089M | RNase HII | 1KU |
| R7089L | RNase HII | 5KU |
| R7090S | Thermostable RNase H | 250U |

| | | |
|---------|----------------------|---------|
| R7090M | Thermostable RNase H | 1000U |
| R7090L | Thermostable RNase H | 5000U |
| R7090FT | Thermostable RNase H | 50U |
| R7092S | RNase R | 500U |
| R7092M | RNase R | 2KU |
| R7092L | RNase R | 10KU |
| R7096S | RNase T1 | 100000U |
| R7096M | RNase T1 | 500000U |

Version 2024.10.10