

RNase III

(*Escherichia coli*)

RNase III

(*Escherichia coli*)

Artikel Nr.	Größe
E1340-01	200 Einheiten
E1340-02	1000 Einheiten

Definition der Einheit:

Eine Einheit wird als die Menge des Enzyms definiert, die erforderlich ist, um 1 µg dsRNA in siRNA innerhalb von 20 Minuten bei 37°C in einem Reaktionsvolumen von 50 µl umzusetzen.

Lagerbedingungen:

Lagerung bei -20°C

Quelle:

E.coli Stamm, enthaltend ein Plasmid mit dem *rnc*-Gen für *E.coli* RNaseIII.

Literatur:

1. Yang, D. et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 9942-9947.
2. Calegari, F. et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 14236-14240.
3. Donze, O. und Picard, D. (2002) *Nucleic Acids Res*, 30, e46. *Laboratory, Cold Spring Harbour*.
4. Morlighem, J.E. et al. (2007) *Biotechniques*, 42, 59 9-606.
5. Evguenieva-Hackenberg, E. und Klug, G. (2000) *J. Bacteriol.* 182, 4719.
6. Nicholson, A. (1999) *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 371.
7. Drider, D. et al. (1999) *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1, 337.
8. Grunberg-Manago, M. (1999) *Annual Rev. Genet.* 33, 193.

Beschreibung:

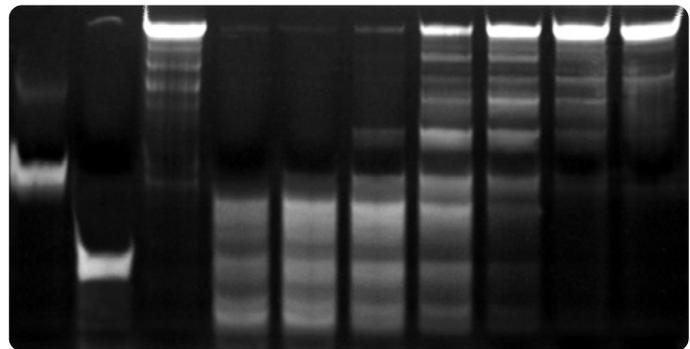
- Verdau von langer doppelsträngiger dsRNA zu kurzen dsRNA Fragmenten.
- Nach Transfektion kurzkettiger RNaseIII-Spaltprodukte kann RNAi in Säugerzellen induziert werden.
- Für Studien zur RNA-Sekundärstruktur (5).
- Für RNA-Prozessierungs- und -Reifungsstudien (6-8).
- Die Endoribonuklease benötigt divalente Kationen.

Spur	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Einheiten				6	3	1.5	0.75	0.37	0.18	0.09

MW
[bp]

25

16



RNaseIII-Verdau von dsRNA. Spur 1, 2 - Marker: dsDNA Fragmente 25bp, 16 bp; Spur 3: Ungeschnittenes Substrat (1.5 µg pre-tRNA für Glycin aus *T. thermophilus*); Spuren 4-10: Unterschiedliche Mengen an RNaseIII: 6 U, 3 U, 1.5 U, 0.75 U, 0.37 U, 0.18 U und 0.09 U. Der Schnitt wurde für 20 Minuten bei 37°C durchgeführt, auf einem 20% [w/v] TBE-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Lagerungspuffer (Storage Buffer):

30 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM Dithiothreitol, 0.5 mM EDTA, 50% Glycerin, pH 8.0 @ 25°C.

10x Reaktionspuffer (Reaction Buffer):

300 mM Tris-HCl, 1.6 M NaCl, 10 mM Dithiothreitol, 1 mM EDTA, pH 8.0 @ 25°C.

Packungsinhalt

Reagenz	E1340-01	E1340-02
10 x Reaktionspuffer	750 µl	2 x 1.5 ml
MnCl ₂ , 0.5 M	200 µl	1.0 ml
RNaseIII, 2 U/µl	100 µl	500 µl
RNase freies Wasser	1.0 ml	3 x 1.5 ml

Qualitätskontrolle:

Alle Chargen werden auf Endonuklease-, Exonuklease-, unspezifische RNase sowie einzel- und doppelsträngige DNase- Aktivitäten geprüft. Typische Präparationen sind zu mehr als 90 % rein, wie aufgrund von SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese beurteilt werden kann.

RNase III

VERDAU - PROTOKOLL

Durchführung des RNaseIII-Schnitts:

Die folgenden Reaktionskomponenten auf Eis mischen:

Komponente	Volumen pro Reaktion	Endkonzentration
10 x Reaktionspuffer	5 µl	1x
MnCl ₂	2 µl	20 mM
RNA-Substrat	1-4 µg	20-80 ng/µl
RNaseIII, 2 U/µl	1-2 µl	2-4 U
H ₂ O, Nukleasefrei	@ 50 µl	-
Gesamtvolumen	50 µl	-

Für 30-60 Minuten bei 37°C inkubieren.

Wenn Spaltprodukte für die Transfektion von Zellkulturen aus menschlichen bzw. Säugerzellen eingesetzt werden sollen, empfehlen wir das EURx Universal RNA/miRNA Purification Kit (Best. Nr. E3599) für eine saubere, effiziente und phenol-chloroformfreie Aufreinigung kurzer RNA-Fragmente in hoher Qualität.

Methode für die Herstellung genspezifischer dsRNA als RNaseIII-Substrat

Genspezifische dsRNA als Substrat für RNaseIII-Schnitt kann schnell, unaufwändig und in hoher Ausbeute mit dem EURx T7 Transcription Kit (Best. Nr. E0901) synthetisiert werden. Hier eine kurze Übersicht über die Methode, die leicht an eigene, spezifische Experimente angepasst werden kann.

- 1. PCR-Amplifikation:** Das Zielgen wird mit zwei Startmolekülen (Primer) amplifiziert, deren 5'-Enden eine T7-Promotorsequenz tragen.

T7 RNA Polymerase - Primer Design:

| Erkennung | > Transkriptions-Start
 | -17 | -5 | -1 |
 5' - T AAT ACG ACT CAC TAT A -3'

Die vier mit blauer Schrift markierten Nukleotide können variabel gewählt werden, sollten aber entweder A oder T sein. T7 RNA Polymerase benötigt oberhalb (am 5'-Ende) der konservierten Erkennungssequenz 5 bis 6 weitere, frei wählbare Nukleotide (markiert mit grüner Schrift). Die ersten an das 3'-Ende des Promotors anschließenden Nukleotide (markiert mit roter Schrift) sollten GG, AG oder GA sein. Wenn möglich, sollte sich der genspezifische Primerabschnitt erst bei deutlich höheren Temperaturen als 55°C an die Vorlagen-DNA (template) anlagern können (annealing). Hier ein Beispiel für eine verbreitete 5'-terminale Primererweiterung zur Anfügung eines T7 Promotors mittels PCR:

5' - GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG - Sequenzspezifischer Primerabschnitt -3'

- 2. DNA-Reinigung:** PCR-amplifizierte DNA wird mit dem EURx PCR/DNA Clean-Up DNA Purification Kit (Best. Nr. E3520) oder, nach Ausschneiden der Bande aus einem Agarosegel, mit dem EURx Agarose-Out DNA Purification Kit (Best. Nr. E3540) aufgereinigt. Typischerweise können auf diese Weise 20-25-µg hochwertiger, RNase-freier Vorlagen-DNA für T7 Transkription hergestellt werden.
- 3. T7 RNA-Transkription:** RNA wird mit dem EURx T7 RNA Transkriptionskit (Best. Nr. E0901) transkribiert, wie in dem Kit beiliegenden Protokoll beschrieben. 1-2 µg gereinigter, RNase-freier (!) DNA wird als Ausgangsmaterial für eine 25 µl Reaktion benötigt.

Hinweis: Eine T7 RNA Transkription ist auch dann möglich, wenn beide Primer an ihren 5'-Enden einen T7 Promotor tragen. T7 RNA Polymerasemoleküle, die eine Transkription an entgegengesetzten Enden der Vorlagen-DNA beginnen und sich deshalb auf dem DNA Strang treffen, beeinflussen sich nicht gegenseitig, wenn sie sich unterwegs begegnen.