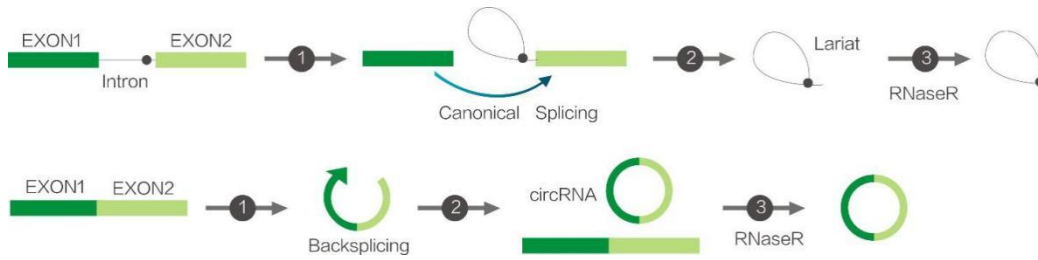




GSPure® RNase R

RNase R (Ribonuclease R) 是一种来源于大肠杆菌 RNR 超家族的 3'-5'核糖核酸外切酶，可从 3'-5'方向将 RNA 逐步切割成二核苷酸和三核苷酸。RNase R 可消化几乎所有的线性 RNA 分子，但不易消化环形 RNA、套索结构或 3'突出末端少于 7 个核苷酸的双链 RNA 分子。RNase R 常用于基因表达和可变剪切研究，可消化线性 RNA 以使环形 RNA (circRNAs) 或套索结构 RNA (lariat RNA) 得到富集。



产品组分:

货号	规格	组分	容量	保存条件
R0301	500 U	RNase R	25 μ L (20U/ μ L)	-25°C~-18°C
		10 \times Reaction Buffer	1 mL	
R0302	5000 U	RNase R	250 μ L (20U/ μ L)	
		10 \times Reaction Buffer	10 mL	

Storage Buffer : 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% Triton X-100, 50%(v/v)Glycerol。

10 \times Reaction Buffer : 200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 M KCl, 1 mM MgCl₂。

单位定义:

标准反应体系下，于 37°C，10 min 将 1 μ g poly(A)转化成酸溶核苷酸所需的酶量定义为一个活力单位(U)。

质量控制:

SDS-PAGE 检测纯度>95%; Total RNA 经 RNase R 消化后进行 RT-qPCR 检测，线性 RNA 丰度明显降低，环形 RNA 丰度基本不变。



RNase R 消化实验:

1. 反应体系

表 1 推荐的 GSPure® RNase R 反应体系

RNA	< 5 µg	> 5 µg
10× Reaction Buffer	2 µL	5 µL
RNase R (20U/µL)	1~3 U/µg RNA	1~3 U/µg RNA
RNase-Free Water	Up to 20 µL	Up to 50 µL

2. 37°C 孵育 15min

注: 1) RNase R 消化实验需根据实验进行调整, 一般情况下, 3U RNase R 在 37°C 下反应 15min 可完全消除 1µg 线性 RNA;

2) RNase R 在 0.1~0.5 mM Mg²⁺ 存在时活性最高, 反应中 EDTA 可能降低 RNase R 活性, 此时可额外添加 MgCl₂ 使 Mg²⁺ 浓度最高达到 0.5 mM;

3) 经 RNase R 消化后可不做纯化, 70°C 保持 10 min 失活 RNase R 后可直接进行 RT-PCR; 也可不灭活, 直接纯化后进行下游实验。

3. 纯化回收

消化后的 RNA 可使用苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24:1, V: V) 溶液(或 Trizol Reagent) 抽提, 再使用乙醇沉淀回收; 或者使用 RNA 纯化柱或磁珠进行纯化回收。

Q&A:

1. 消化时间的选择

一般 10~30 min 即可消化掉大部分线性 RNA, PCR 检测线性 RNA 丰度有几百倍的降低, 也可按需求适当延长消化时间, 但不推荐 1h 以上的消化, 因为时间过长可能导致少数耐受力弱的 circRNAs 被消化。

2. 内参的选择与定量计算

1) 情况 1: RNase R 消化后“直接”进行 RT-qPCR 检测

对消化组 (RNase R+) 与对照组 (RNase R-) 的 circRNA 的进行定量计算时, 应统一以对照组 (RNase R-) 的 β-actin 或 GAPDH 为内参;

2) 情况 2: RNase R 消化后“纯化回收”再进行 RT-qPCR 检测

在纯化前加入少量其他物种的 RNA 作为外参, 统一以外参标准化样品后再进行计算。

3. 实验结果一致性 (重复性) 差

1) RNase R 消化/逆转录/PCR 过程中加样不准确; 2) RNase R 的用量有偏差; 3) 其他 RNase 污染。

4. 线性 RNA 消化不成功

1) 反应体系中的 NaCl 浓度过高抑制了 RNase R 的活性, 或存在 RNase R 的失活剂 EDTA;

2) 某些没有 3' 突出末端的结构化线性 RNA 或含有 G-四联体的线性 RNA 可能耐受 RNase R 消化。

5. 环状 RNA 也被消化了

1) 外源 RNase 污染, 使用 RNase-Free 耗材, 反应体系可适当加入 RNase inhibitor;

2) 少数 circRNAs 耐受 RNase R 消化力弱的, 可尝试减少 RNase R 用量或缩短消化时间。