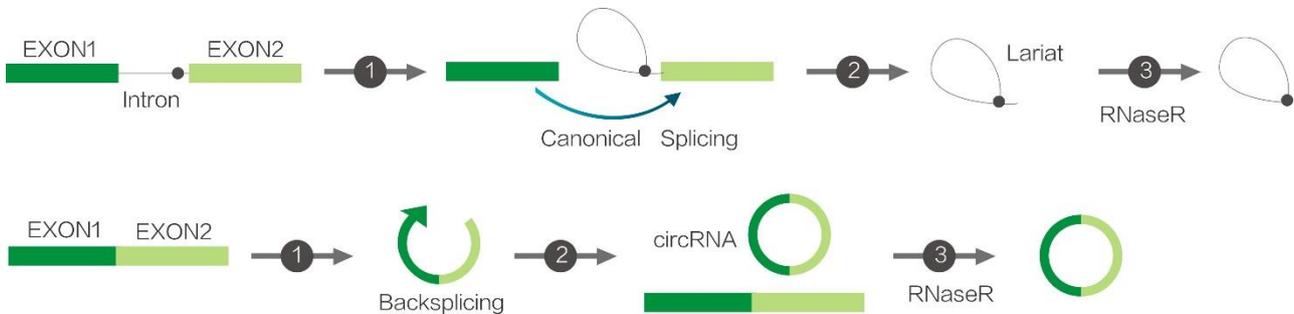




## Ribonuclease R (RNase R)

货号	试剂	规格	保存条件
R0301	RNase R (20U/μL)	500 U	-20℃
	10X Reaction Buffer	1 mL	

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:

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% Glycerol
10X Reaction Buffer	200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 M KCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub>

### 单位定义:

标准反应体系下，于 37℃，10 min 将 1 μg 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)。

### 反应体系:

20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 37℃ 孵育。

注: 1) RNase R 在 0.1-0.5 mM Mg<sup>2+</sup>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 MgCl<sub>2</sub> 使 Mg<sup>2+</sup>浓度最高达到 0.5 mM。2) 孵育后可于 70℃，10 min 使酶失活，再进行下游实验（如逆转录）；也可不灭活，直接纯化后进行下游实验。

### 质量控制:

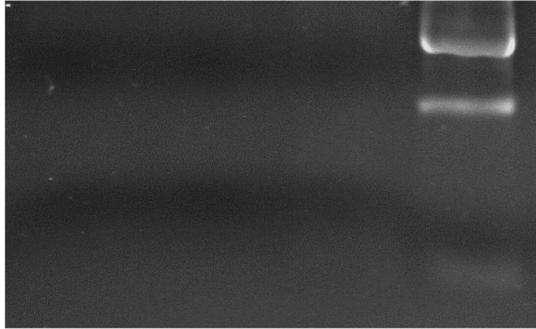
SDS-PAGE 检测纯度>99%；Total RNA 经 RNase R 消化后进行 RT-qPCR 检测，线性 RNA 丰度明显降低，环形 RNA 丰度基本不变。

### 参考文献:

1. Cheng ZF, Deutscher MP. J. Biol. Chem. 2002; 277:21624–21629.
2. Suzuki H et al.. Nucleic Acids Res. 2006; 34(8), e63.
3. Vincent HA, Deutscher MP. J Biol Chem. 2006 Oct 6; 281(40):29769-75.



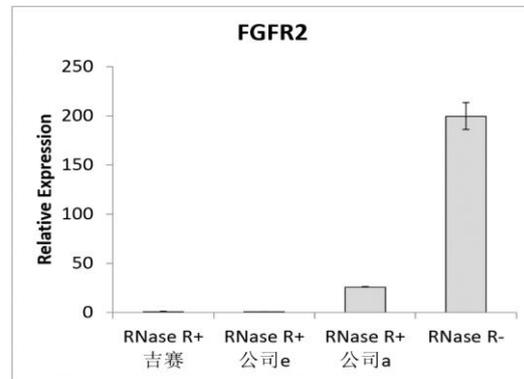
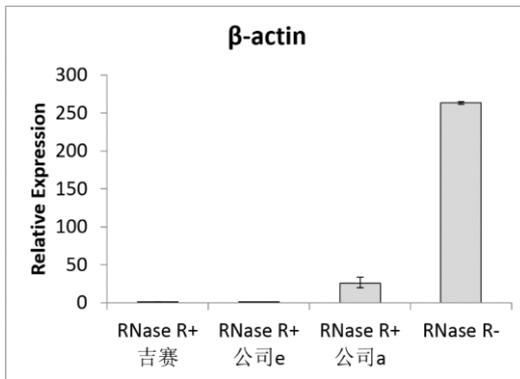
### 性能比较-RNA 电泳检测:



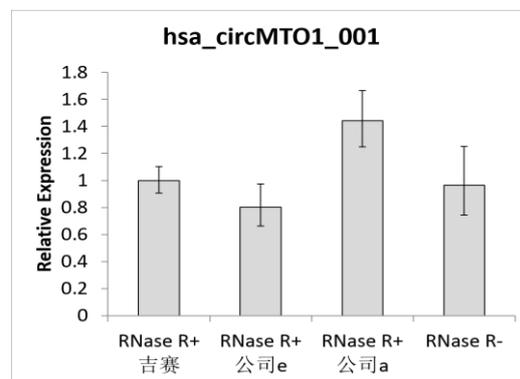
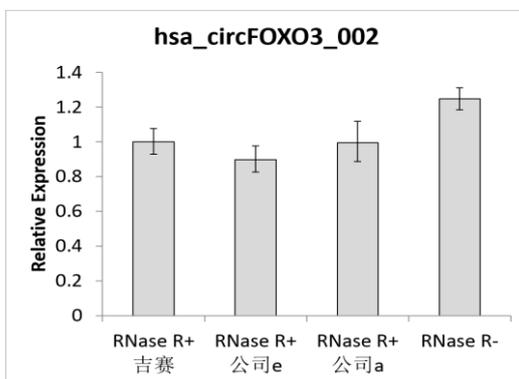
RNase R+ 吉赛    RNase R+ 公司 e    RNase R+ 公司 a    RNase R-

28S 将 10U RNase R 加入到 2.5  $\mu$ g total RNA 中,于 37 $^{\circ}$ C  
18S 孵育 30 min, 之后直接进行电泳检测, 结果显示  
RNase R+ 组中 28/18/5S 条带变淡 (不可见), 表  
明 RNase R 对 total RNA 的消化作用。吉赛和公司  
e 或公司 a 的 RNase R 对 total RNA 消化效果相当。

### 性能比较-RT-qPCR 检测:



将 10U RNase R 加入到 2.5  $\mu$ g total RNA 中, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 之后进行 RT-qPCR 实验, 结果显示 RNase R+ 组中  $\beta$ -actin 和 FGFR2 的丰度都明显降低, 表明 RNase R 可消化线性 RNA。吉赛和公司 e 的 RNase R 对线性 RNA 消化效果相当, 优于公司 a 的 RNase R。



将 10U RNase R 加入到 2.5  $\mu$ g total RNA 中, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 之后进行 RT-qPCR 实验, 结果显示 RNase R+ 组中 hsa\_circFOXO3\_002 和 hsa\_circMTO1\_001 的丰度基本不变, 表明环形 RNA 耐受 RNase R 的消化。吉赛和公司 e 或公司 a 的 RNase R 效果相当。

注: 数据计算以“RNase R+吉赛”组为对照, 设定其相对丰度值为 1。



## RNase R 消化实验:

### 1 反应体系

表 1 推荐的 RNase R 消化体系

RNA	< 5 $\mu\text{g}$	> 5 $\mu\text{g}$
10X Reaction Buffer	2 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
RNase R (20U/ $\mu\text{L}$ ) *	1-3 U/ $\mu\text{g}$ RNA	1-3 U/ $\mu\text{g}$ RNA
RNase-Free Water *	Up to 20 $\mu\text{L}$	Up to 50 $\mu\text{L}$

\*: RNase R 用量和反应体系总体积需要根据实验进行调整。

### 2 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。经 RNase R 消化后直接进行 RT-PCR 的, 一般可以不做纯化, 保持 70°C, 10 min 使酶失活后直接进行逆转录反应即可。

注: 苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1, V: V) 溶液最好现配现用, 没有试剂也可以 Trizol (LS) Reagent 代替。

## 常见问题:

### 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

RNase R 消化后不能再使用  $\beta$ -actin 或 GAPDH 作为内参, 因此可以将原始的 RNA 等分为两份, 一份进行 RNase R 处理 (RNase R+), 另一份不处理 (RNase R-), 统一以 RNase R- 组中的内参为计算标准。

如果在 RNase R 消化后进行纯化回收, 则 RNA 浓度/总量可能有变化, 导致测量浓度过低或不准确, 不适宜再以 RNase R- 组的内参作为计算标准, 此时可在纯化回收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进行计算。

### 3 实验结果一致性 (重复性) 差

- 1) 加样不准确。RNA 或 RNase R 的用量有偏差, 导致内参不齐或者消化程度不一致。在同一对比实验中, 除了是否加 RNase R 外, 应确保其他所有条件一致。
- 2) 两次重复实验结果不一致。尽量同时进行 RNase R+ 和 RNase R- 组的消化实验, 使用相同的反应条件, PCR 检测使用同样的条件和引物等。

### 4 消化不成功

- 1) 检测 mRNAs 和 circRNAs 丰度都没有明显变化。可能是因为 RNase R 消化反应体系、PCR 检测等有



误。实验中应使用配套的 10X Reaction Buffer 配置反应液，可以尝试调整反应体系和条件，额外添加  $MgCl_2$  ( $Mg^{2+}$  终浓度最高 0.5 mM) 也可以增强反应中 RNase R 的活性。建议 RNase R 消化后先取部分进行电泳检测，确认 28/18/5S 条带变淡或不可见，否则可能是未成功消化。

- 2) RNase R+ 组中检测不到 circRNAs。可能由于 circRNAs 丰度过低未能检测到，或者 RNA 被外源 RNase 降解。实验中应使用 RNase-Free (DEPC 处理) 的枪头、离心管和水等耗材试剂。
- 3) RNase R+ 组中 circRNAs 丰度有明显降低。除了考虑被外源 RNase 降解外，也有发现少数 circRNAs 耐受 RNase R 消化力弱的，提示检测的 circRNAs 可能被消化，可以尝试减少 RNase R 用量或缩短消化时间。PCR 检测应使用高特异性的引物，注意区分 circRNAs 和 mRNAs 可能有的同源序列。
- 4) 线性 RNA 消化不完全。限定反应体系和时间时线性 RNA 不太可能被彻底消化，但应能检测到线性 RNA 丰度明显降低。某些没有 3' 突出末端的结构化线性 RNA (如 snRNAs, snoRNAs, Y RNAs) 或含有 G-四联体 (G-quadruplex) 的线性 RNA 可能耐受 RNase R 消化，可以尝试以 RPAD (high-purity circular RNA isolation method) 或组合 A-Tailing/LiCl-buffer RNase R 消化方法进行调整优化。

#### 参考文献:

1. Cheng ZF, Deutscher MP. J. Purification and characterization of the Escherichia coli exoribonuclease RNase R. Comparison with RNase II. *Biol. Chem.* 2002; 277:21624–21629.
2. Rybak-Wolf, A. et al.. Circular RNAs in the mammalian brain are highly abundant, conserved, and dynamically expressed. *Mol. Cell.* 58, 870–885 (2015).
3. Yibing Yang et al.. Novel Role of FBXW7 Circular RNA in Repressing Glioma Tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2018 Mar 1;110(3).
4. Suzuki H et al.. Characterization of RNase R-digested cellular RNA source that consists of lariat and circular RNAs from pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34(8), e63.
5. Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, et al.. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature.* 2013;495(7441):333–338.
6. Jeck WR, Sharpless NE. Detecting and characterizing circular RNAs. *Nat Biotechnol.* 2014; 32:453–61.
7. Guarnerio J, Bezzi M, Jeong JC, Paffenholz SV, Berry K, Naldini MM et al.. Oncogenic Role of Fusion-circRNAs Derived from Cancer-Associated Chromosomal Translocations. *Cell.* 2016 Aug 11;166(4):1055-1056.
8. Legnini I, Di Timoteo G, Rossi F, Morlando M, Briganti F, Sthandier O, Fatica A, Santini T, Andronache A, Wade M, et al.. Circ-ZNF609 Is a Circular RNA that Can Be Translated and Functions in Myogenesis. *Mol Cell.* 2017;66(1):22–37.e29.
9. Zhang, Y., Yang, L., and Chen, L.L. (2016c). Characterization of Circular RNAs. *Methods Mol. Biol.* 1402, 215–227.
10. Panda AC, Gorospe M. Detection and Analysis of Circular RNAs by RT-PCR. *Bio Protoc.* 2018 Mar 20;8(6). pii: e2775.
11. Pamudurti NR, Bartok O, Jens M, Ashwal-Fluss R, Stottmeister C, Ruhe L et al.. Translation of CircRNAs. *Mol Cell.* 2017 Apr 6;66(1):9-21.e7.
12. Panda AC, De S, Grammatikakis I, Munk R, Yang X, Piao Y, et al.. High-purity circular RNA isolation method (RPAD) reveals vast collection of intronic circRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jul 7;45(12):e116.
13. Xiao MS, Wilusz JE. An improved method for circular RNA purification using RNase R that efficiently removes linear RNAs containing G-quadruplexes or structured 3' ends. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jul 3. pii: gkz576.