

QKGEN[®] rRNA Depletion Kit
(Human/Mouse/Rat)

使用说明书 (V1.0)

本产品仅供科研用途

第一部分 产品信息

一、产品说明

QKGEN® rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat)采用 RNase H 消化的方法从 100 ng-1 ug 的人/小鼠/大鼠 Total RNA 中去除细胞质 ribosomal RNA(5S rRNA、5.8S rRNA、18S rRNA 和 28S rRNA)及线粒体 ribosomal RNA(12S rRNA 和 16SrRNA), 保留 mRNA 及其它非编码 RNA。所得产物适用于 RNA 文库、random-primer cDNA 合成及其它实验。

二、特点

可有效去除高达 99%的人/小鼠/大鼠的各种 ribosomal RNA。

提供 Control qPCR Primer Sets, 检测去除前后 ribosomal RNA 和非 ribosomal RNA 含量的变化。

三、适用范围

人/小鼠/大鼠总 RNA(100ng-1 µg)样品。

适用于完整或部分降解(例如 FFPE RNA)的 RNA 样品。

四、试剂盒组成

Component	QRR1096 (96 rxn)
rRNA Probe (H/M/R)	192 µL
<i>E.coli</i> RNase H	96 µL
DNase I	480 µL
5×Hybridization Buffer	288 µL
10×RNase H Buffer	192 µL
10×DNase I Buffer	480 µL
RNase-free Water	8 × 1 mL
Ribosomal RNA Primer Mix	192 µL
Non-ribosomal RNA Primer Mix	192 µL

五、保存方法

-30 ~ -15°C保存; 干冰运输。有效期 1 年。

第二部分 操作步骤

自备材料：磁力架，新鲜配制的 80% 乙醇(使用 RNase-free Water 配制)，RNA Beads

1、RNA 样品与探针杂交

(1) 将 RNase-free PCR 管置于冰上，根据下表配置体系：

Component	Volume
Total RNA	× μL (100 ng-1 μg)
rRNA Probe(H/M/R)	2 μL
5×Hybridization Bufier	3 μL
RNase-free Water	to 15 μL

(2) 用移液枪吹吸混匀。管壁上如有液体可瞬时离心。

(3) 将样品置于 PCR 仪中，按以下程序操作，进行探针杂交反应，设置热盖温度 105 °C。

温度	时间
95°C	2 min
95°C → 22°C	0.1 °C/sec
22 °C	5 min
4 °C	hoLd

(注意降温过程必须慢速降温。)

(4) 反应结束后，瞬时离心后置于冰上，并立即进行下步反应。

2、RNase H 消化

(1) 将上一步反应产物置于冰盒上，根据下表配置 RNase H 消化体系：

Component	Volume
杂交反应产物	15 μL
10×RNase H Buffer	2 μL
E.coli RNase H	1 μL
RNase-free Water	2 μL
Total volume	20 μL

- (2) 用移液枪吹吸混匀。管壁上如有液体可瞬时离心。
- (3) 置于 PCR 仪中 37°C 孵育 15 分钟（热盖温度 40°C）。
- (4) 反应结束后，瞬时离心后置于冰上，并立即进行下步反应。

3、DNase I 消化

- (1) 将上一步反应产物置于冰盒上，根据下表配置 DNase I 消化体系：

Component	Volume
RNase H 消化反应产物	20 μ L
10 $\times$ DNase I Buffer	5 μ L
DNase I	5 μ L
RNase-free Water	20 μ L
Total volume	50 μ L

- (2) 用移液枪吹吸混匀。管壁上如有液体可瞬时离心。
- (3) 置于 PCR 仪中 37°C 孵育 15 分钟（热盖温度 40°C）。
- (4) 反应结束后，瞬时离心后置于冰上，并立即进行下步反应。

4、RNA beads 纯化

- (1) 将 50 μ L 最终反应产物全部转移到 RNase-free 1.5 mL 离心管中。加入 110 μ L (2.2 $\times$) RNAbeads，用移液枪吹吸混匀。

注意：混匀不充分会显著影响实验结果。

- (2) 冰上孵育 15 分钟。

- (3) 将 1.5 mL 离心管置于磁力架上，室温静置至溶液澄清(约 5 分钟)，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上，弃上清。

注意：管壁上如有液体可瞬时离心后置于磁力架上，务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠，否则会影响最终产量。

- (4) 保持 1.5 mL 离心管在磁力架上，向管中加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇(使用 RNase-free Water 配制)，不要吹吸磁珠，室温静置 30 秒，弃上清。

注意：一定要使用新鲜配制的乙醇，否则会影响实验结果。

- (5) 重复步骤 4 一次。

- (6) 保持 1.5 mL 离心管在磁力架上，室温晾干至磁珠刚刚出现干裂(约 5 分钟)。

注意：一定要晾干磁珠，否则会影响后续实验。切勿加热晾干，否则会影响最终产量。

(7) 将 1.5 mL 离心管移出磁力架，加入 12 μ L RNase-free Water 洗脱 RNA，用移液枪吹吸混匀，或者涡旋混匀，室温静置 2 分钟。

(8) 将 1.5 mL 离心管置于磁力架上，室温静置 2 分钟至溶液澄清，使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。

注意：管壁上如有液体可瞬时离心后置于磁力架上，室温静置时间可延长至 5 分钟，务必使磁珠全部吸附在管壁上。

(9) 转移 10 μ L 洗脱液至新的 RNase-free 管中，于冰上进行 NGS 文库构建等下游实验，或 -80°C 保存。

5、qRT-PCR 检测（可选步骤）

本试剂盒提供 1 对 ribosomal RNA 的 qPCR 引物(Ribosomal RNA Primer Mix) 和 1 对非 ribosomal RNA 的 qPCR 引物 (Non-ribosomal RNA Primer Mix)，建议以 rRNA 去除前后的 RNA 为模板进行 qRT-PCR 检测，以判断 rRNA 去除效率。

为保证一致性，建议对照 RNA 虽未经过 rRNA 去除处理（操作步骤 1-3），但需进行 RNA beads 纯化（操作步骤 4，纯化前需将等体积总 RNA 样品用 RNase-free Water 补到 50 μ L）。

qRT-PCR 建议模板量

两步法 qRT-PCR：RT 反应用 2 μ L RNA 作模板，合成第一链 cDNA；qPCR 用 2 μ L 第一链 cDNA 产物作为模板。一步法 qRT-PCR：用 10 倍稀释的 RNA 作为模板。

qRT-PCR 反应体系

参考实际使用的试剂盒说明书操作：第一链 cDNA 合成→qPCR