

QKGEN[®] rRNA Depletion Kit
(Plant)

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、产品简介

本产品采用 RNase H 消化法去除植物根、种子和叶片 Total RNA 中的核糖体 RNA（包括 25S、18S、5S 和线粒体 rRNA 26S、18S；叶绿体 rRNA 23S、16S），保留 mRNA 和其他非编码 RNA 信息（lncRNA、circRNA 等）。本试剂盒对于完整和部分降解的 RNA 均有良好的 rRNA 去除效果，经 rRNA 去除所获得的 RNA 可用于 mRNA 和非编码 RNA 的高通量测序分析，能显著提高测序结果中有效数据比例。

二、适用范围

适用于多种植物来源的 0.1-2μg Total RNA 样本，针对不同的组织部位具有良好的兼容性。

三、产品组分

组分名称	QRR2096 (96rxn)
Probe Buffer	288 μL
Probe Mix (H/M/R)	192 μL
RNase H Buffer	192 μL
RNase H	96 μL
DNase I Buffer	480 μL
DNase I	96 μL

四、保存方法

-30 ~ -15℃保存；干冰运输。有效期 1 年。

五、自备材料

RNA 纯化磁珠、Nuclease-free ddH₂O、无水乙醇、低吸附头、Nuclease-free PCR

管、磁力架、PCR 仪等。

六、注意事项：

1. 为保证 rRNA 去除效率，RNA 样品不应含盐离子（例如 Mg^{2+} 或胍盐）和有机物（例如苯酚和乙醇）。
2. RNA 样品不应有基因组 DNA 污染，若样品中有 gDNA 残留，应先进行 DNase I 消化并纯化后再用于本试剂盒。
3. RNA 样品最大投入体积为 10 μL ，若样品体积较大，可先进行 RNA 样品浓缩。
4. 用于 RNA-Seq 的样品，建议 Total RNA 起始量高于 100 ng，以增加文库的复杂性。

第二部分 实验流程

（一）探针杂交

1. 在一个 200 μL Nuclease-free PCR 管中，用 Nuclease-free ddH₂O 将 0.1~1 μg Total RNA 稀释至 10 μL ，置于冰上备用。
2. 按照表 1 在一个 Nuclease-free PCR 管中配制探针杂交反应体系。有多个样品时，可先将 Probe Buffer 和 Probe Mix (H/M/R) 混合配成 Master Mix，按照实际反应数的 1.1 倍配置体积，以抵消吸液损耗。然后准确吸取 5 μL Master Mix 加入 Total RNA 中。

表 1. 探针杂交反应体系

组分	体积 (μL)
Probe Buffer	3
Probe Mix (H/M/R)	2
Total RNA	10 (0.1~1 μg)
Total	15

3. 使用移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心将样品收集至管底。
4. 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。

表 2. 探针杂交反应程序

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

(二) rRNA 去除

1. 按照表 3 配置 RNase H 消化反应体系。有多个样品时，可先将 RNase H Buffer 、RNase H 和 Nuclease-free ddH₂O 混合配成 Master Mix，按照实际反应数的 1.1 倍配置体积，以抵消吸液损耗。然后准确吸取 5 μL Master Mix 加入上一步产物中：

表 3. RNase H 消化反应体系

组分	体积 (μL)
上一步产物	15
RNase H Buffer	4
RNase H	1
Total	20

2. 用移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心将样品收集至管底。
3. 将上述样品置于 PCR 仪中，设置反应程序：37°C 30 min，4°C Hold，热盖温度 105°C。

(三) DNase I 消化

1. 按照表 4 配制 DNase I 消化反应体系。有多个样品时，可先将 DNase I Buffer 、DNase I 和 Nuclease-free ddH₂O 混合配成 Master Mix，按照实际反应数的 1.1 倍配置体积，以抵消吸液损耗。然后准确吸取 30 μL Master Mix 加入上一步产物中。

表 4. DNase I 消化反应体系

组分	体积 (μL)
上一步产物	20
DNase I Buffer	5
DNase I	1
Nuclease-free ddH ₂ O	24
Total	50

2. 用移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心将样品收集至管底。
3. 将上述样品置于 PCR 仪中，设置反应程序：37°C 30 min，4°C Hold，热盖温度 105°C。

(四) RNA 纯化

1. 准备工作：将 RNA 纯化磁珠从冰箱中取出，室温平衡至少 30 min。另外用 Nuclease-free ddH₂O 配制 80%乙醇待用。
2. 涡旋震荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。
3. 吸取 110 μL RNA 纯化磁珠(2.2×, Beads:RNA=2.2:1)至上一步产物中，使用移液器充分吹打混匀，室温孵育 5 min。
4. 将 PCR 管置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后(约 5 min)，小心吸弃上清。
5. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 200 μL Nuclease-free ddH₂O 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec 后，小心吸弃上清。
6. 重复步骤 5，总计漂洗两次，用 10 μL 吸头吸弃残留液体。
7. 保持 PCR 管始终置于磁力架中，室温下开盖干燥磁珠 5~10 min。
8. RNA 洗脱：将 PCR 管从磁力架上取下，加入 11 μL Nuclease-free ddH₂O (或使用适合下游实验的相应体积 Nuclease-free ddH₂O 或洗脱缓冲液)，使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 5 min。
9. 将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后(约 3 min)，小心移取 10 μL 上清(可根据步骤 8 选择的实际洗脱体积进行相应调整)至新的 Nuclease-free PCR 管中。

【注】洗脱后的样品请立即进行下游实验，或置于-80°C存放。