



## Ribomoval® rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat)

### 产品简介

Ribomoval® rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) 采用 RNase H 消化法去除人、小鼠和大鼠 Total RNA 中的核糖体 RNA (包括 28S、18S、5.8S、5S 和线粒体 rRNA 16S、12S)，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。

### 适用范围

适用于人、小鼠或大鼠来源的 0.1~1µg Total RNA 样本。

### 产品组分

组分名称	S0101 (12 rxns)	S0102 (24 rxns)	S0103 (48 rxns)	S0104 (96 rxns)
● Probe Buffer	36 µL	72 µL	144 µL	288 µL
● Probe Mix (H/M/R)	12 µL	24 µL	48 µL	96 µL
● RNase H Buffer	48 µL	96 µL	192 µL	384 µL
● RNase H	12 µL	24 µL	48 µL	96 µL
● DNase I Buffer	60 µL	120 µL	240 µL	480 µL
● DNase I	12 µL	24 µL	48 µL	96 µL

### 运输与保存

干冰运输，-30°C~ -15°C 保存，有效期一年。

### 自备材料

RNA 纯化磁珠、Nuclease-free ddH<sub>2</sub>O、无水乙醇、低吸附吸头、Nuclease-free PCR 管、磁力架、PCR 仪等。

### 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<sup>2+</sup>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 11 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。



## 实验流程

### 1. 探针杂交

1.1 在一个 200  $\mu\text{L}$  Nuclease-free PCR 管中, 用 Nuclease-free ddH<sub>2</sub>O 将 0.1~1  $\mu\text{g}$  Total RNA 稀释至 11  $\mu\text{L}$ , 置于冰上备用。

1.2 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  $\mu\text{L}$  Master Mix 加入 Total RNA 中。

表 1 探针杂交反应体系

组分	1×反应体积 ( $\mu\text{L}$ )
Probe Buffer	3
Probe Mix (H/M/R)	1
Total RNA	11 (0.1~1 $\mu\text{g}$ )
<b>Total</b>	<b>15</b>

1.3 使用移液器轻轻吹打混匀, 瞬时离心将样品收集至管底。

1.4 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

### 2. rRNA 去除

2.1 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 和 RNase H 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  $\mu\text{L}$  Master Mix 加入上一步产物中。

表 3 RNase H 消化反应体系

组分	1×反应体积 ( $\mu\text{L}$ )
RNase H Buffer	4
RNase H	1
上一步产物	15
<b>Total</b>	<b>20</b>

2.2 使用移液器轻轻吹打混匀, 瞬时离心将样品收集至管底。

2.3 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。



### 3. DNase I 消化

3.1 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 和 DNase I 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  $\mu$ L Master Mix 加入上一步产物中。

表 4 DNase I 消化反应体系

组分	1 $\times$ 反应体积( $\mu$ L)
DNase I Buffer	5
DNase I	1
Nuclease-free ddH <sub>2</sub> O	24
上一步产物	20
<b>Total</b>	<b>50</b>

3.2 使用移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心将样品收集至管底。

3.3 将上述样品置于 PCR 仪中，设置反应程序：37 $^{\circ}$ C 30 min，4 $^{\circ}$ C Hold，热盖温度 105 $^{\circ}$ C。

### 4. RNA 纯化

4.1 准备工作：将 RNA 磁珠从冰箱中取出，室温平衡至少 30 min。另外用 Nuclease-free ddH<sub>2</sub>O 配制 80%乙醇待用。

4.2 涡旋震荡或充分颠倒磁珠以保证充分混匀。

4.3 吸取 110  $\mu$ L RNA 磁珠 (2.2 $\times$ , 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。

4.4 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。

4.5 保持 PCR 管始终置于磁力架中，加入 200  $\mu$ L Nuclease-free ddH<sub>2</sub>O 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。

4.6 重复步骤 4.5，总计漂洗两次，用 10  $\mu$ L 吸头吸弃残留液体。

4.7 保持 PCR 管始终置于磁力架中，室温下开盖干燥磁珠 5~10 min。

4.8 RNA 洗脱：将 PCR 管从磁力架上取下，加入 11  $\mu$ L Nuclease-free ddH<sub>2</sub>O (或使用适合下游实验的相应体积 Nuclease-free ddH<sub>2</sub>O 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。

4.9 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  $\mu$ L 上清 (可根据步骤 4.8 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 $^{\circ}$ C存放。



## 案例展示

### 高通量测序验证 Ribomoval® rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) 对 rRNA 去除效果

实验各取三份 1 μg 和 0.1 μg Human/Mouse/Rat total RNA 利用 Ribomoval™ rRNA Depletion Kit 及 K company 试剂盒对 rRNA 进行去除，对未进行 rRNA 去除与 rRNA 去除后的样品搭配吉赛生物自主研发的 RNA 文库制备试剂盒 (#S05) 进行文库构建，测序后并与其基因组数据库进行对比。

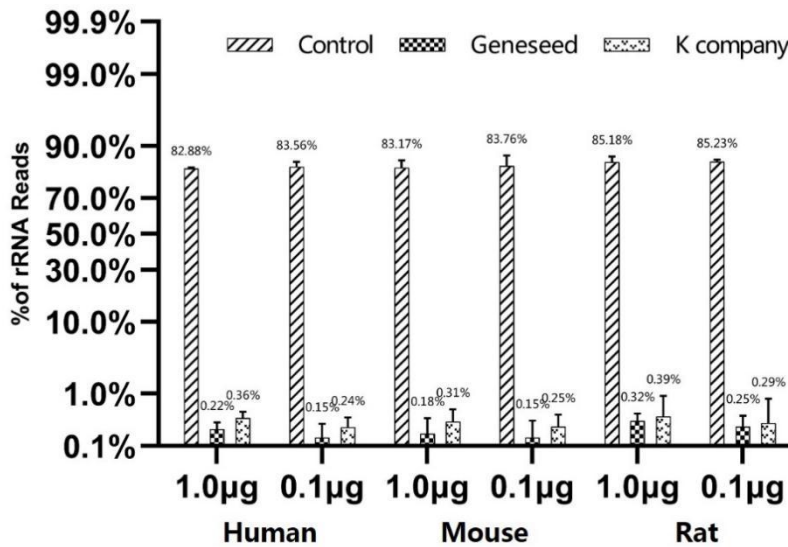


图 1 rRNA 残留率比较图

图 1 显示 Ribomoval® rRNA Depletion Kit 对 1 μg 和 0.1 μg Human/Mouse/Rat total RNA 中的 rRNA 均有显著去除效果。同时与 K company 试剂盒对比，Ribomoval® rRNA Depletion Kit 的 rRNA 残留率更低，去除效果更优。