

版本号: NR210831

TIANSeq rRNA Depletion Kit (H/M/R)

TIANSeq核糖体RNA去除试剂盒(人/小鼠/大鼠)

目录号: NR101

产品内容

产品组成	NR101-01 (6 rxn)	NR101-02 (24 rxn)	NR101-03 (96 rxn)
Ribo Hybridization Probe (H/M/R)	18 μ l	72 μ l	4 \times 72 μ l
5 \times Hybridization Buffer	18 μ l	72 μ l	4 \times 72 μ l
Ribo RNase H	18 μ l	72 μ l	4 \times 72 μ l
10 \times Ribo RNase H Buffer	12 μ l	48 μ l	4 \times 48 μ l
Ribo DNase I	18 μ l	72 μ l	4 \times 72 μ l
10 \times DNase I Buffer	30 μ l	120 μ l	4 \times 120 μ l
RNase-Free ddH ₂ O	1 ml	2 \times 1 ml	8 \times 1 ml
rRNA Primer Mix	12 μ l	48 μ l	4 \times 48 μ l
mRNA Primer Mix	12 μ l	48 μ l	4 \times 48 μ l

储存条件

-30~-15 $^{\circ}$ C 保存, 保质期为一年, 尽量避免反复冻融。

产品简介

TIANSeq rRNA Depletion Kit (H/M/R) 采用特殊设计的DNA探针与核糖体RNA (rRNA) 杂交, 随后利用Ribo RNase H降解DNA-rRNA杂交链中的rRNA, 从而去除人、小鼠、大鼠总RNA中的细胞质核糖体RNA (28S、18S、5.8S、5S) 和线粒体内核糖体RNA (16S、12S), 保留信使RNA (mRNA) 和其它非编码RNA。

该试剂盒对于完整和部分降解的总RNA (如FFPE RNA) 均具有良好的rRNA去除效果, 所获得的去除了rRNA的RNA样本可用于mRNA和非编码RNA高通量测序, 可显著提高测序结果中有效数据比例, 纯化产物也可用于随机引物cDNA合成或其它下游应用。

产品特点

样本广泛: 适用于高质量 (完整) 及部分降解 (如FFPE) 样本中rRNA的去除。

高效去除: 有效去除95~99.9%的人/小鼠/大鼠的rRNA。

数据全面: 保留了不完整mRNA和非编码RNA信息, 使转录组数据更加全面。

快速评估: 试剂盒中提供的引物可快速评估rRNA的去除效果。

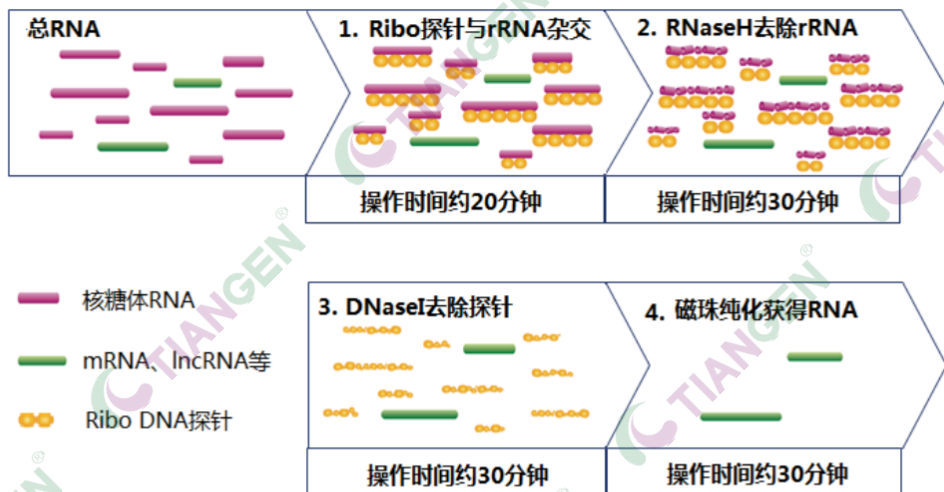
推荐使用的其他试剂

1. 去除rRNA的RNA纯化: TIANSeq RNA Clean Beads (TIANGEN Cat#NG307)。
2. PCR检测rRNA去除效率, FastKing RT Kit (With gDNase) (TIANGEN Cat#KR116), SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) (TIANGEN Cat#FP205) 。

注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 操作过程请注意避免核酸样品和产物之间的交叉污染。
2. 请使用不含RNA酶或DNA酶的枪头、离心管进行实验。
3. 实验开始前, 请清洁操作台, 建议使用RNA酶及DNA酶清除试剂处理台面。确保没有RNA酶和DNA酶的污染。

操作流程示意图



操作步骤

一、探针与rRNA杂交

1. 在200 μl Nuclease-Free PCR管中，用RNase-Free ddH₂O将100~1000 ng人/小鼠/大鼠的总RNA稀释至9 μl ，冰上放置备用。

注意：总RNA样品中应无DNA、盐离子（例如Mg²⁺、胍盐）、有机试剂（例如酚、乙醇）残留，否则可能导致非预期的RNA降解或去除效率降低。

2. 参照下表配制探针反应液：

组分名称	体积
5× Hybridization Buffer	3 μl
Ribo Hybridization Probe (H/M/R)	3 μl
Total	6 μl

3. 将步骤2的6 μl 探针反应液加入到步骤1装有9 μl RNA样品的PCR管中，用移液器吸吹混匀10次。

4. 瞬时离心，将样品置于PCR仪中（启用热盖99~105°C均可），按以下程序操作，总共耗时约20 min。

注意：必须慢速降温(每秒降温0.1°C)，使探针与rRNA充分杂交。

步骤	温度	时间
1	95°C	2 min
2	95 to 37 °C	0.1 °C/sec
3	37 °C	5 min hold

二、Ribo RNase H消化rRNA

1. 参照下表在冰上配制Ribo RNase H反应液，并用移液器吸吹混匀10次。

组分名称	体积
10× Ribo RNase H Buffer	2 μl
Ribo RNase H	3 μl
Total	5 μl

2. 将5 μl Ribo RNase H反应液加入步骤一的产物中，构成20 μl反应体系，用移液器吸吹混匀10次。
3. 瞬时离心，将样品置于PCR仪中（启用热盖40°C），37°C孵育30 min。
4. 瞬时离心，将样品置于冰上，立即进入下步操作。

三、Ribo DNase I消化探针

1. 参照下表在冰上配制Ribo DNase I反应液，并用移液器轻轻吸吹混匀10次。

组分名称	体积
RNase-Free ddH ₂ O	22 μl
10× DNase I Buffer	5 μl
Ribo DNase I	3 μl
Total	30 μl

2. 将30 μl Ribo DNase I反应液加入步骤二的产物中，构成50 μl反应体系，用移液器吸吹混匀10次。
3. 瞬时离心，将样品置于PCR仪中（启用热盖40°C），37°C孵育30 min。
4. 瞬时离心，将样品置于冰上，立即进入下步操作。

四、RNA纯化

推荐使用磁珠纯化产品TIANSeq RNA Clean Beads (TIANGEN Cat#NG307), 也可使用Agencourt RNAClean XP (Beckman Coulter)。

1. 涡旋振荡混匀TIANSeq RNA Clean Beads, 吸取110 μl (2.2倍体积) 至步骤三的50 μl RNA产物, 用移液器吸吹混匀10次。
2. 室温静置15 min, 使RNA充分结合到磁珠上。
3. 将样品置于磁力架上5 min, 待溶液澄清后, 用移液器小心移除上清。
4. 保持样品始终处于磁力架上, 加入200 μl 新鲜配制的80%乙醇 (每次实验需要新鲜配制, 因为乙醇易从空气中吸收水分, 浓度降低影响实验效果) 漂洗磁珠 (不要吹散磁珠), 室温孵育30 sec, 小心移除上清。
5. 重复步骤4进行漂洗。
6. 取出离心管短暂低速离心 (<2000 g, 10 sec), 使液体收集至管底, 将样品放回磁力架, 用移液器小心弃去所有液体。
7. 保持样品始终处于磁力架上, 开盖晾干磁珠3~5 min (不要过度干燥, 否则可能降低RNA回收率。洗脱应当在磁珠依然显深棕色且光亮, 而且所有可见液体已完全挥发时进行。若磁珠出现裂缝, 则表示已过度干燥)。
8. 将样品从磁力架上取出, 加入6.5 μl RNase-Free ddH₂O, 用移液器吹打10次混匀磁珠, 室温静置2 min。
注意: 上述洗脱体积适用于TIANSeq RNA文库构建试剂盒NR102或NR103, 如搭配其他RNA建库产品, 请根据产品说明书选择合适的洗脱体积。
9. 在磁力架上静置2 min, 待溶液澄清后, 不要触动磁珠, 小心吸取5 μl 上清 (可根据步骤8选择的实际洗脱体积进行相应调整, 尽量充分利用洗脱产物) 至新的Nuclease-Free PCR管。
10. 洗脱样品可立即用于RNA测序文库构建或其他分析应用, 也可在-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存过夜或在-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存30天。

五、Real-time PCR检测（可选步骤）

本试剂盒提供两对定量PCR引物，分别为18S rRNA的rRNA Primer Mix和beta-actin的mRNA Primer Mix。建议以不进行处理的等量初始总RNA为对照（需用RNase-Free ddH₂O或洗脱缓冲液稀释至洗脱体积），以评估rRNA去除效率和mRNA损失比例。

两步法示例：逆转录用1 μl 的RNA产物作模板，合成第一链cDNA，然后定量PCR用2 μl cDNA作模板。试剂盒使用FastKing RT Kit (With gDNase) (TIANGEN Cat#KR116)和SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) (TIANGEN Cat#FP205)。

1. 逆转录

1) 参照下表在冰上配制逆转录反应液：

组分名称	体积
RNase-Free ddH ₂ O	12 μl
5×gDNA Buffer	2 μl
10×King RT Buffer	2 μl
FQ-RT Primer Mix	2 μl
FastKing RT Enzyme Mix	1 μl
RNA	1 μl
Total	20 μl

2) 用移液器吸吹混匀并短暂离心，置于PCR仪中（热盖99-105℃），42℃孵育15 min，随后95℃孵育3 min。

3) 取出瞬时离心，得到的cDNA可用于后续定量实验，或在-20℃保存。

2. 定量PCR（以Bio-Rad CFX96为例）

1) 使用Nuclease-Free PCR管，参照下表在冰上配制定量PCR反应液：

组份名称	体积
2×SuperReal PreMix Plus	10 μl
50×ROX Reference Dye	0 μl▲
rRNA Primer Mix或mRNA Primer Mix	1 μl
cDNA模板	2 μl
RNase-free ddH ₂ O	至20 μl

- 2) 用移液器吸吹混匀并短暂离心。
- 3) 将各管反应样品置于定量PCR仪中，参照下表开始进行检测：

阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1×	95℃	15 min	预变性	否
PCR反应	40×	95℃	10 sec	变性	否
		60℃	30 sec ▲	退火/延伸	是
熔解曲线分析 (Melting/Dissociation Curve Stage)					

▲ 此处以Bio-Rad CFX96 Real Time System为例，其它定量PCR仪器请参照仪器使用说明书或SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) (TIANGEN Cat#FP205) 试剂盒说明书的建议。

3. 供参考的两步法RT-PCR结果示例：

引物	1 μg RNA样品	Ct值		
		Human	Mouse	Rat
rRNA	未经rRNA去除	9.26	7.41	8.12
Primer Mix	经rRNA去除	28.87	26.95	27.22
mRNA	未经rRNA去除	19.32	21.28	20.38
Primer Mix	经rRNA去除	19.44	21.74	20.31
rRNA去除率		99.9%	99.9%	99.9%

去除率计算方法：

$$\Delta Ct = Ct (\text{经rRNA去除}) - Ct (\text{未经rRNA去除})$$

$$\text{去除率} = \left(1 - \frac{1}{2^{\Delta Ct}}\right) \times 100\%$$



TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

浓缩国际权威精华， 铸就TIANGEN优秀品质！

TIANGEN为您提供国际化标准的生物学产品和服务

- PCR、RT-PCR系列
- 核酸DNA、RNA分离纯化系列
- DNA分子量标准
- 克隆载体、感受态细胞
- 细胞生物学产品
- 蛋白分子量标准
- 蛋白质染色、检测及定量相关产品