

rRNA Depletion Kits (Human rRNA & Globin)

RK30209



使用说明书

Version: N19C26v1.2

目录

1. 产品概述 1

2. 产品组分 1

3. 保存及运输条件 1

4. 其他自备材料 1

5. 操作注意事项 1

6. 操作步骤 2

1. 产品概述

rRNA Depletion Kits (Human rRNA & Globin) (ABclonal, Cat. RK30209) 是专门针对人血样本设计的从总 RNA 中去除 rRNA 及珠蛋白(Globin) mRNA 的试剂盒。该试剂盒适用于模板为 10-1000 ng 总 RNA，通过链霉亲和素磁珠吸附法有效去除 rRNA（包括细胞质 rRNA 和线粒体 rRNA）及 Globin mRNA，保留其他 mRNA 和非编码 RNA 以用于后续全转录组测序、长链非编码 RNA 测序等相关领域的研究。

该试剂盒主要包含 Ribo-Pools 探针与目标 RNA 杂交、链霉亲和素磁珠预处理、rRNA 去除和 RNA 纯化四个步骤。整个操作流程可在 60 分钟内完成，无酶切反应，兼容高通量自动化。

2. 产品组分

	组分名称	4 RXN	24 RXN	96 RXN
RK30209 (2-1)	Probe Mix	13.5 μ L	80 μ L	317 μ L
	Hybridization buffer	25 μ L	150 μ L	600 μ L
RK30209 (2-2)	Depletion buffer	800 μ L	4.6 mL	18.5 mL
	Streptavidin-coated magnetic beads	176 μ L	1056 μ L	4.23 mL
	Purification beads	795 μ L	4.75 mL	19 mL

3. 保存及运输条件

模块名称	保存条件	运输条件
RK30209 (2-1)	-20℃	干冰运输
RK30209 (2-2)	4℃	冰袋运输

4. 其他自备材料

4.1. 其他试剂与耗材

80%乙醇（新鲜配制）、磁力架、PCR 仪等。

5. 操作注意事项

- Input RNA 无DNA污染；
- 在操作过程中，避免让RNA管盖开封（孵育时）或长时间处于室温状态。
- 采取必要的预防措施以避免RNase污染，如保持工作区域清洁，戴手套，不要在开口管上方讲话或工作。
- rRNA去除后，由于rRNA的高丰度，预计损失 $\geq$ 95%初始RNA量。
- 使用前将RK30209 (2-2)所有试剂平衡至室温。
- 使用前磁珠需彻底混匀。

6. 操作步骤

6.1. 探针与 rRNA 杂交

- 6.1.1. 将 Probe Mix 解冻后涡旋混匀并离心,冰上放置备用;将 Streptavidin-coated magnetic beads 和 Hybridization buffer 试剂平衡至室温备用。
- 6.1.2. 取 10-1000 ng RNA 样品,加入 Nuclease-free Water 稀释至 12 μL,冰上放置备用。
- 6.1.3. 按照下表依次加入各组份:

试剂	体积
Hybridization buffer	5 μL
Probe Mix	3 μL
Total RNA	12 μL
总体积	20 μL

- 6.1.4. 将制备好的上述反应体系使用移液器轻轻吹打 15-20 次充分混匀,瞬时离心收集溶液至管底。置于 PCR 仪中,运行如下反应程序(热盖温度 105℃):

温度	时间
68℃	10 min
68-37℃	0.1℃/sec 降温速率
37℃	立即进行下一步操作*

备注: 采用梯度退火之后,需要尽快进入 6.3 操作步骤,严禁PCR程序中出现4℃ hold,否则会影响去除效果。

6.2. Streptavidin-coated magnetic beads 预处理

- 6.2.1. 低速涡旋振荡使 Streptavidin-coated magnetic beads 充分悬浮。
- 6.2.2. 每个样品取 40 μL Streptavidin-coated magnetic beads 置于新的 RNase-free 的 PCR 管中。
- 6.2.3. 将上述 PCR 管转移至磁力架上静置 2 min,待溶液变澄清后,移除上清液,注意不要吸到磁珠;
- 6.2.4. 将 PCR 管从磁力架上取下,加入 80 μL 的 Depletion buffer,使用移液器轻轻吹打 15-20 次充分混匀;
- 6.2.5. 重复 6.2.3 到 6.2.4 步骤。

6.3. rRNA 去除

- 6.3.1. 将步骤 6.1.4 产物瞬时离心,加入预处理好的 80 μL Streptavidin-coated magnetic beads (步骤 6.2.5),涡旋混匀。
- 6.3.2. 在室温下孵育 15 min,孵育期间每隔 5 min 涡旋混匀一次。
- 6.3.3. 随后置于 PCR 仪(热盖温度 105℃)中执行如下程序:

温度	时间
50℃	5 min
立即进行下一步操作*	

备注: 去除反应程序完成后,需要尽快进入下一操作步骤,严禁PCR程序中出现4℃ hold,否则会影响去除效果。

6.3.4. 反应结束后立即将样品管放置磁力架上静置约2 min;

6.3.5. 待溶液变澄清后, 小心将上清液 (约 96 μ L) 转移至新的 RNase-free 的 PCR 管中, 注意不要吸到磁珠。

—— 安全停止点: 该产物可在-20℃下保存一夜, 或在-80℃下保存一个月。 ——

6.4. RNA 纯化

6.4.1. 提前将 Purification beads 取出, 室温平衡 30 min, 使用前涡旋混匀。

6.4.2. 吸取180 μ L Purification beads 加入步骤 6.3.5 产物中, 吹打混匀, 室温静置 5 min。

6.4.3. 将离心管转移至磁力架上静置 5 min, 直至溶液变澄清, 小心弃除上清, 注意不要吸到磁珠。

6.4.4. 将离心管保持在磁力架上, 加入新鲜配制的 300 μ L 80%乙醇, 静置30 s, 弃除全部上清。

6.4.5. 重复 6.4.4 步骤, 重复洗涤一次。

6.4.6. 将离心管保持在磁力架上, 使用 10 μ L 移液器移除管底残留的乙醇, 室温下开盖干燥磁珠 3-5 min, 待酒精挥发完全 (磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色)。

6.4.7. 根据实验目的的需要, 选择不同的步骤:

A. 若用于 RNA 文库构建: 参照 RNA 建库说明书 (ABclonal, Cat. RK20306) 加入 1X Frag/Elute Buffer, 立即进行后续建库反应步骤;

B. 若洗脱产物用于其他实验: 将样品管从磁力架上取下, 加入10-15 μ L RNase-free 的水, 吹打混匀, 室温孵育 5 min; 然后将离心管转移至磁力架上静置 1 min, 待溶液变澄清后, 小心吸取上清液至另一新的 RNase-free 的PCR管中用于后续实验, 或-80℃保存。

武汉爱博泰克生物科技有限公司

电话: 400-999-6126

邮箱: cn.market@abclonal.com

网址: www.abclonal.com.cn

地址: 湖北省武汉市江夏区东湖高新区高科园 3 路精准医疗产业基地项目一期 5 号楼