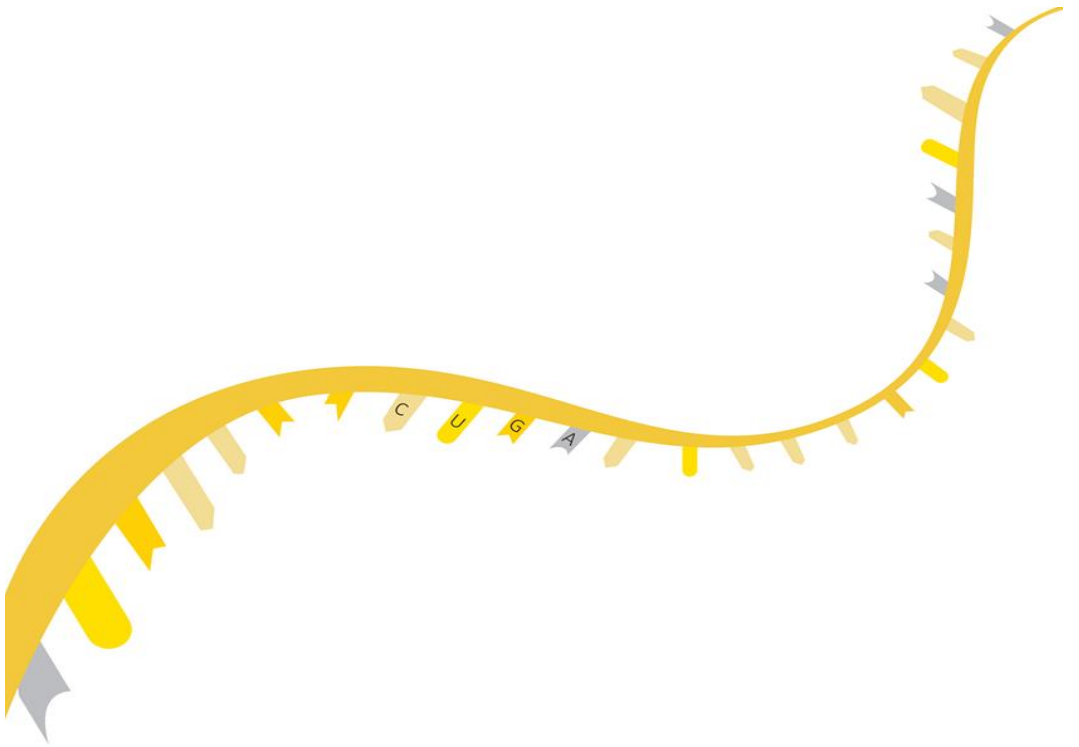




rRNA Depletion Module (H/M/R)

RK20348



www.abclonal.com
version: N15D03v1.0

Contents

1. 产品介绍.....	1
2. 产品组分.....	1
3. 保存条件.....	2
4. 自备材料.....	2
5. 操作注意事项.....	2
6. 实验过程.....	3

1. 产品介绍

rRNA depletion module (H/M/R)主要针对的样本是人、小鼠和大鼠的 total RNA, 可以有效去除总 RNA 中的细胞质 rRNA (包含细胞质 5S rRNA, 5.8S rRNA, 18S rRNA 和 28S rRNA) 和线粒体 rRNA (包含 12S rRNA 和 16S rRNA) ; 产物可用于 Whole RNA seq 的文库构建或其他 rRNA depletion 分析;

本产品不但适用完整性较好的 total RNA 样本, 也适用于发生降解的 RNA 样本, 如 FFPE RNA。Total RNA 起始量要求为 10 ng-1 µg。

试剂盒中的每种试剂都经过了严格的质量控制, 且每一批次的建库 Kit 都经过了建库和上机测序的验证, 保证每一批次的试剂盒性能质量稳定。

2. 产品组分

试剂组分	24 RXN	96 RXN
Probe Hybridization Buffer	48 µL	192 µL
rRNA Probe Mix(H/M/R)	24 µL	96 µL
RNase H	48 µL	192 µL
10X RNase H Buffer	48 µL	192 µL
DNase I	60 µL	240 µL
10X DNase I Buffer	120 µL	480 µL

3. 保存条件

-20°C保存。

4. 自备材料

- ◆ Agencourt RNAClean XP beads (*Beckman Coulter Inc., cat. no. A63987*)
- ◆ 80%乙醇 (新鲜配制)
- ◆ 磁力架
- ◆ PCR 仪等

5. 操作注意事项

- ◆ 在操作 RNA 的实验过程中应戴口罩、手套，RNA 样本冰上放置，并尽快进入后续实验，避免 RNA 发生降解；
- ◆ 磁珠使用前请提前半小时拿出，放置于室温平衡，磁珠纯化过程中，必须待酒精完全挥发后再加入 Nuclease-free Water 洗脱，即磁珠颜色从光亮褐色变为磨砂褐色，酒精未挥发完全或者磁珠过分干燥（变龟裂）均会影响核酸回收效率；
- ◆ 试剂盒中的酶溶液对温度敏感，使用过程中应放置于冰上或置于低温盒中，且使用结束后尽快放回-20°C冰箱进行保存；

6. 实验过程

1 Probes 与 rRNA hybridization

1.1 取 10 ng-1 μ g total RNA，加入 Nuclease-free Water 稀释至 12 μ L 体积，冰上放置备用；

1.2 取出 Probe Hybridization Buffer 冰上融解，按照下面体系配制 probe hybridization 预混液：

试剂	体积
Probe Hybridization Buffer	2 μ L
rRNA Probe Mix(H/M/R)	1 μ L
总体积	3 μ L

*：可以按照样本个数（建议 1.1 倍）提前配制预混液，再分装至每个样本管中。

1.3 将 3 μ L probe hybridization 预混液加至提前准备好的 12 μ L RNA 溶液中，移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心；

1.4 置于 PCR 仪（热盖 105°C）中，使 probes 与 rRNA 进行杂交：

温度	时间
95°C	2 min
95-22°C	0.1°C/s, 匀速降温至 22°C
22°C	5 min

1.5 杂交结束后，将样本从 PCR 仪中取出，置于冰上，立即进行 RNase H 消化；

2 RNase H 消化

2.1 提前将 10X RNase H Buffer 取出冰上融解，按照下面体系配制 RNase H 反应预混液：

试剂	体积
10X RNase H Buffer*	2 μ L
RNase H*	2 μ L
Nuclease-free Water*	1 μ L
总体积	5 μ L

*：可以按照样本个数（建议 1.1 倍）提前配制预混液，再分装至每个样本管中。

2.2 将 5 μ L RNase H 反应预混液加至 1.5 步骤的溶液中，使 RNase H 反应体系达到 20 μ L，移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心；

2.3 将反应体系置于 PCR 仪（热盖 \geq 45 $^{\circ}$ C）中，进行 RNase H 反应：

温度	时间
37 $^{\circ}$ C	30 min

2.4 RNase H 反应结束后，将样本从 PCR 仪中取出置冰上，立即进行 DNase I 消化；

3 DNase I 消化

3.1 提前将 10X DNase I Buffer 取出冰上融解，按照下面体系配制 DNase I 反应预混液：

试剂	体积
10X DNase I Buffer*	5 μ L
DNase I*	2.5 μ L
Nuclease-free Water*	22.5 μ L
总体积	30 μ L

* : 可以按照样本个数（建议 1.1 倍）提前配制预混液，再分装至每个样本管中。

3.2 将 30 μL DNase I 反应预混液加至 2.4 步骤的溶液中，使 DNase I 反应体系达到 50 μL ，移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心；

3.3 将反应体系置于 PCR 仪（热盖 $\geq 45^\circ\text{C}$ ）中，进行 DNase I 消化：

温度	时间
37 $^\circ\text{C}$	30 min

3.4 DNase I 反应结束后，将样本从 PCR 仪中取出置冰上，立即进行 RNA 纯化；

4 rRNA-depleted RNA 纯化

4.1 提前将 Agencourt RNAClean XP beads 从 2-8 $^\circ\text{C}$ 取出，静置平衡 30 min 至室温，使用前涡旋或者振荡混匀；

4.2 DNase I 反应结束后，每个反应管中加入 110 μL Agencourt RNAClean XP beads (2.2X)，吹打混匀；

4.3 室温静置 5 min，然后转移至磁力架上 5 min，直至溶液变澄清，小心弃除上清；

4.4 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μL 80%乙醇，静置 30 s，弃除全部上清；

4.5 重复 4.4 步骤，将磁珠用 80%乙醇再洗 1 次。用 10 μL 枪头将残留液体彻底吸干；

4.6 干燥磁珠 2-3 min，待酒精挥发完全后，加入 7 μL Nuclease-free Water，吹打混匀；

4.7 室温静置 2 min，磁力架上 1 min，待溶液变澄清，小心吸取 5 μL 上清至另一新的离心管中。

4.8 制备好的 rRNA depleted RNA 可以直接进行后续的 RNA-seq 的文库构建，具体流程参考 ABclonal Fast RNA-seq Lib Prep Module for Illumina (ABclonal, Cat. RK20304) 或者 ABclonal Stranded mRNA-seq Lib Prep Kit for Illumina (ABclonal, Cat. RK20349)，或者进行其他的 RNA 后续分析；

中国

www.abclonal.com.cn

中国总部：武汉市东湖新技术开发区高新二路 388 号光谷国际生物医药
企业加速器三期 7 栋 4 层

上海分部：上海市浦东新区张江高科技园区哥白尼路 150 号 1 号楼三楼

北京分部：北京市朝阳区北沙滩甲一号中科电大厦 702 室

南京分部：南京市白下区石鼓路 98 号阳光大厦 20 楼 C 座

成都分部：成都市金牛区一环路北三段 1 号金牛万达广场 SOHO D 座 3210 室

杭州分部：杭州市西湖区古墩路 671 号申悦国际 B 座 1530

电话：400-999-6126

邮箱：cn.market@abclonal.com