

DG™ rRNA Depletion Kit

(Human/Mouse/Rat)

NC901-01/02/03



Version 9.1

产品简介

DG™ rRNA depletion kit (H/M/R) 采用特殊设计的 DNA 探针与核糖体 RNA (rRNA) 杂交, 用于去除人、小鼠和大鼠总 RNA 中的 rRNA (包括细胞质 28S, 18S, 5.8S, 5S rRNA 以及线粒体 12S, 16S rRNA), 保留 mRNA 以及其它非编码 RNA; 该试剂盒适用于完整的和部分降解的 RNA 样本 (例如 FFPE RNA), 得到的去除了 rRNA 的 RNA 样本可用于 mRNA 和非编码 RNA 的高通量测序。

产品组成

产品组分	NC901-01 (6 rxn)	NC901-02 (24 rxn)	NC901-03 (96 rxn)
rRNA Probe (H/M/R)	6 µl	24 µl	96 µl
Probe Buffer	18 µl	72 µl	288 µl
RNase H Buffer	24 µl	96 µl	384 µl
RNase H	6 µl	24 µl	96 µl
DNase I Buffer	174 µl	696 µl	4×696 µl
DNase I	6 µl	24 µl	96 µl
Nuclease-free 水	1 ml	1 ml	1 ml

储存条件

-20 °C 保存, 尽量避免反复冻融。

推荐所需的其他试剂

磁力架

100% 乙醇

Nuclease-free PCR 管

Agencourt RNAClean XP (Beckman #A63987)

操作步骤

1. 样品准备

1.1 在一个 Nuclease-Free PCR 管中, 用 Nuclease-free 水将 100~1000 ng 总 RNA 稀释至 11 µl, 冰上放置备用。

2. 探针与 rRNA 杂交

2.1 参照下表配制探针反应液:

rRNA Probe (H/M/R)	1 µl
Probe Buffer	3 µl
总 RNA	11 µl
总计	15 µl

用移液器轻轻吹打混匀。

2.2 瞬时离心, 将样品置于 PCR 仪中, 按以下程序操作。

95 °C	2 min
95 to 22 °C	0.1 °C/sec
22 °C	5 min
4 °C	hold

2.3 瞬时离心，并置于冰上，立即进入下步操作。

3. RNase H 消化

3.1 在冰上制备如下反应液：

RNase H Buffer	4 µl
RNase H	1 µl
上一步产物	15 µl
总计	20 µl

用移液器轻轻吹打混匀。

3.2 瞬时离心，将样品置于 PCR 仪中（启用热盖 40 °C），37 °C 孵育 30 min。

3.3 瞬时离心，将样品置于冰上，立即进入下步操作。

4. DNase I 消化探针

4.1 在冰上制备如下反应液：

DNase I Buffer	29 µl
DNase I	1 µl
上一步产物	20 µl
总计	50 µl

用移液器轻轻吹打混匀。

4.2 将样品置于 PCR 仪中（启用热盖 40 °C），37 °C 孵育 30 min。

4.3 瞬时离心，将样品置于冰上，立即进入下步操作。

5. RNA 纯化

推荐使用 Agencourt RNAClean XP (Beckman Coulter) 磁珠进行纯化。

5.1 涡旋振荡混匀 Agencourt RNAClean XP Beads，吸取 110 µl (2.2 ×) 至上步 RNA 样品中，用移液器吹打 10 次以彻底混匀。

5.2 冰上静置 15 分钟，使 RNA 结合到磁珠上。

5.3 将样品置于磁力架上 5 分钟，待溶液澄清后，小心移除上清。

5.4 保持样品始终处于磁力架中，加入 200 µl 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠（注意不要吹散磁珠），室温孵育 30 秒，小心移除上清。

5.5 重复上一步骤，总计漂洗 2 次。

5.6 保持样品始终处于磁力架中，开盖空气干燥磁珠 5 分钟。（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）

5.7 将样品从磁力架上取出，加入 12 µl Nuclease-free 水（或适合下游实验的相应体积），用移液器吹打 10 次以充分混匀，室温静置 2 分钟。

5.8 在磁力架上静置 2 分钟，待溶液澄清后，小心吸取 10 µl 上清至一个新的 Nuclease-free PCR 管中。

5.9 样品可置于冰上继续进行 NGS 文库构建或其他分析应用，也可置于 -20 °C 保存或在 -80 °C 保存。

注意事项

1. 为保证 rRNA 去除效率，RNA 样品应不含盐离子（例如 Mg²⁺ 或胍盐）和有机物（例如苯酚和乙醇）。
2. rRNA-depleted RNA 的产量取决于起始 RNA 的质量、样品 rRNA 的含量和使用的纯化方法，一般回收率为 3%-10%。
3. 用于 RNA-Seq 的样品，建议总 RNA 起始量高于 100 ng，以增加文库的复杂性。