

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

使用前请仔细阅读说明书

目录号: KD101

保存: -20℃保存一年。

## 产品说明

TransNGS® rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat) 采用 RNase H 消化的方法从 100 ng-1 µg 的人 / 小鼠 / 大鼠 Total RNA 中去除细胞质 ribosomal RNA (5S rRNA、5.8S rRNA、18S rRNA 和 28S rRNA) 及线粒体 ribosomal RNA (12S rRNA 和 16S rRNA), 保留 mRNA 及其它非编码 RNA。所得产物适用于 RNA 文库、random-primed cDNA 合成及其它实验。

## 特点

- 可有效去除高达 99% 的人 / 小鼠 / 大鼠的各种 ribosomal RNA。
- 提供 Control qPCR Primer Sets, 检测去除前后 ribosomal RNA 和非 ribosomal RNA 含量的变化。

## 适用范围

- 人 / 小鼠 / 大鼠总 RNA (100 ng-1 µg) 样品。
- 适用于完整或部分降解 (例如 FFPE RNA) 的 RNA 样品。

## 试剂盒组成

Component	KD101-11 (12 rxns)	KD101-03 (96 rxns)
rRNA Probe (H/M/R)	24 µl	192 µl
<i>E.coli</i> RNase H	12 µl	96 µl
DNase I	60 µl	480 µl
5×Hybridization Buffer	36 µl	288 µl
10×RNase H Reaction Buffer	24 µl	192 µl
10×DNase I Reaction Buffer	60 µl	480 µl
RNase-free Water	1 ml	8×1 ml
Control qPCR Primer Sets	Ribosomal RNA Primer Mix	24 µl
	Non-ribosomal RNA Primer Mix	24 µl

## 操作步骤

自备试剂: 磁力架, 新鲜配制的 80% 乙醇 (使用 RNase-free Water 配制), RNA Beads

### 1、RNA 样品与探针杂交

(1) 将 RNase-free PCR 管置于冰上, 加入

Component	Volume
Total RNA	x µl (10 ng-1 µg)
rRNA Probe(H/M/R)	2 µl
5× Hybridization Buffer	3 µl
RNase-free Water	to 15 µl

(2) 用移液枪吹吸混匀。管壁上如有液体可点甩离心。

(3) PCR 仪中

95℃	2 分钟
95→22℃	0.1℃ / 秒, 约 12 分钟
22℃	5 分钟

(注意降温过程必须慢速降温。)

(4) 点甩离心后置于冰中, 并立即进行下步反应。



## 2、RNase H 消化

(1) 冰上加入

Component	Volume
杂交反应产物	15 $\mu$ l
10 $\times$ RNase H Reaction Buffer	2 $\mu$ l
<i>E.coli</i> RNase H	1 $\mu$ l
RNase-free Water	2 $\mu$ l
Total volume	20 $\mu$ l

(2) 用移液枪吹吸混匀。管壁上如有液体可点甩离心。

(3) PCR 仪中 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟 ( 盖子温度 40 $^{\circ}$ C)。

(4) 置于冰中, 并立即进行下步反应。

## 3、DNase I 消化

(1) 冰上加入

Component	Volume
RNase H 消化反应产物	20 $\mu$ l
10 $\times$ DNase I Reaction Buffer	5 $\mu$ l
DNase I	5 $\mu$ l
RNase-free Water	20 $\mu$ l
Total volume	50 $\mu$ l

(2) 用移液枪吹吸混匀。管壁上如有液体可点甩离心。

(3) PCR 仪中 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟 ( 盖子温度 40 $^{\circ}$ C)。

(4) 置于冰中, 并立即进行下步反应。

## 4、RNA beads 纯化

(1) 将 50  $\mu$ l 最终反应产物全部转移到 RNase-free 1.5 ml 离心管中。加入 110  $\mu$ l (2.2 $\times$ ) RNA beads( 推荐使用 TransGen *MagicPure*<sup>®</sup> RNA Beads, 目录号: EC501), 用移液枪吹吸混匀。

注意: 混匀不充分会显著影响实验结果。

(2) 冰上孵育 15 分钟。

(3) 将 1.5 ml 离心管置于磁力架上, 室温静置至溶液澄清 ( 约 5 分钟), 使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上, 弃上清。

注意: 管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上, 务必使磁珠全部吸附在管壁上。切勿吸到磁珠, 否则会影响最终产量。

(4) 保持 1.5 ml 离心管在磁力架上, 向管中加入 200  $\mu$ l 新鲜配制的 80% 乙醇 ( 使用 RNase-free Water 配制), 不要吹吸磁珠, 室温静置 30 秒, 弃上清。

注意: 一定要使用新鲜配制的乙醇, 否则会影响实验结果。

(5) 重复步骤 4 一次。

(6) 保持 1.5 ml 离心管在磁力架上, 室温晾干至磁珠刚刚出现干裂 ( 约 5 分钟)。

注意: 一定要晾干磁珠, 否则会影响后续实验。切勿加热晾干, 否则会影响最终产量。

(7) 将 1.5 ml 离心管移出磁力架, 加入 12  $\mu$ l RNase-free Water 洗脱 RNA, 用移液枪吹吸混匀, 或者涡旋混匀, 室温静置 2 分钟。

(8) 将 1.5 ml 离心管置于磁力架上, 室温静置 2 分钟至溶液澄清, 使磁珠充分吸附在贴近磁力架的管壁上。

注意: 管壁上如有液体可点甩离心后置于磁力架上, 室温静置时间可延长至 5 分钟, 务必使磁珠全部吸附在管壁上。

(9) 转移 10  $\mu$ l 洗脱液至新的 RNase-free 管中, 于冰上进行 NGS 文库构建等下游实验, 或 -80 $^{\circ}$ C 保存。

## 5、qRT-PCR 检测 ( 可选步骤 )

本试剂盒提供一对 ribosomal RNA 的 qPCR 引物 (Ribosomal RNA Primer Mix) 和一对非 ribosomal RNA 的 qPCR 引物 (Non-ribosomal RNA Primer Mix), 建议以 rRNA 去除前后的 RNA 为模板进行 qRT-PCR 检测, 以判断 rRNA 去除效率。



为保证一致性，建议对照 RNA 虽不经过 rRNA 去除处理（操作步骤 1-3），但需进行 RNA beads 纯化（操作步骤 4，纯化前需将等体积总 RNA 样品用 RNase-free Water 补到 50  $\mu$ l）。

#### qRT-PCR 建议模板量

两步法 qRT-PCR：RT 反应用 2  $\mu$ l RNA 作模板，合成第一链 cDNA；qPCR 用 2  $\mu$ l 第一链 cDNA 产物作为模板。一步法 qRT-PCR：用 10 倍稀释的 RNA 作为模板。

#### 以 TransGen 两步法 qRT-PCR 为例

样品：1  $\mu$ g 人 / 小鼠 / 大鼠总 RNA

试剂：MagicPure<sup>®</sup> RNA Beads（目录号：EC501）、TransScript<sup>®</sup> First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒（目录号：AT301）以及 PerfectStart<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix 试剂盒（目录号：AQ601）。

#### (1) qRT-PCR 体系与条件

##### • 第一链 cDNA 合成

Component	Volume
rRNA depleted/undepleted RNA	2 $\mu$ l
Random Primer(N9)	1 $\mu$ l
2 $\times$ TS Reaction Mix	10 $\mu$ l
TransScript <sup>®</sup> RT/RI Enzyme Mix	1 $\mu$ l
RNase-free Water	6 $\mu$ l
Total volume	20 $\mu$ l

##### 反应条件

25 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟后，42 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟，85 $^{\circ}$ C 加热 5 秒失活 TransScript<sup>®</sup> RT/RI。

##### • qPCR

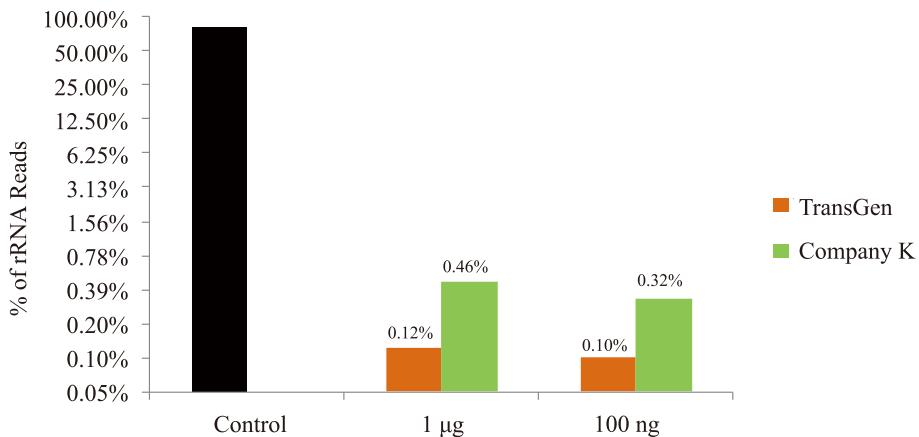
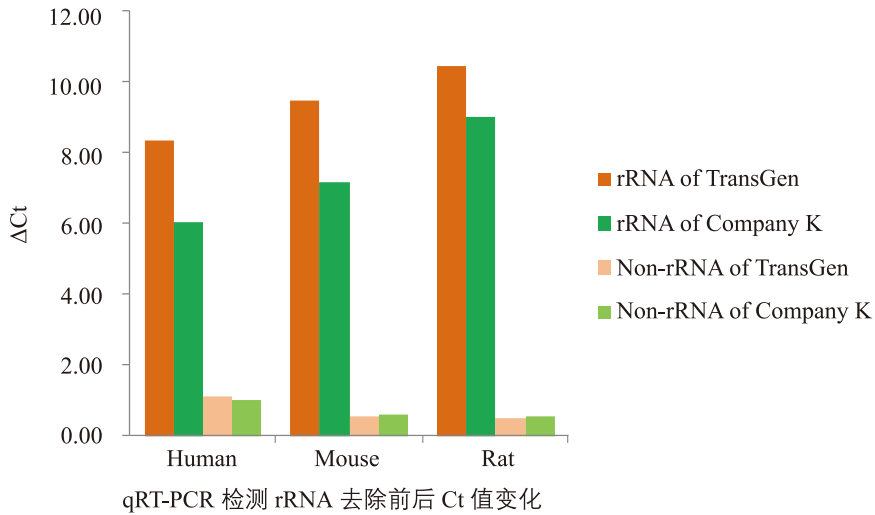
Component	Volume
cDNA	2 $\mu$ l
Ribosomal RNA Primer Mix/Non-ribosomal RNA Primer Mix	1 $\mu$ l
2 $\times$ PerfectStart <sup>®</sup> Green qPCR SuperMix	10 $\mu$ l
Nuclease-free Water	7 $\mu$ l
Total volume	20 $\mu$ l

##### 反应条件

94 $^{\circ}$ C	30 sec	} 40 cycles
94 $^{\circ}$ C	5 sec	
60 $^{\circ}$ C	30 sec	
Dissociation Stage		

#### (2) qRT-PCR 结果





rRNA percentage: 1 μg and 100 ng total RNA from HepG2 cells was treated using rRNA Depletion Kits of TransGen (KD101) and Company K. Sequencing reads were identified as ribosomal using Mirabait with human 18S, 28S, 5S, 5.8S, 12S and 16S ribosomal RNA sequences as baits.

#### 注意事项

- 避免 RNase 污染。
- RNA 样品不应含盐离子 (如  $Mg^{2+}$  或胍盐) 和有机物质 (如苯酚或乙醇)。
- 非 ribosomal RNA 的产量取决于起始 RNA 的质量、起始 RNA 中 rRNA 的含量及 rRNA 去除后的纯化方法等，一般回收率为 3%-10%。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1-202201

服务投诉电话 +86-10-57815020

服务投诉邮箱 complaints@transgen.com.cn

