Version 1

Code No. AG12718

AG12719

AccuNext RNase H-based rRNA 去除试剂盒（人/小鼠/大鼠）

AccuNext RNase H-based rRNA Depletion Kit (Human / Mouse / Rat)

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.

ACCURATE BIOLOGY 艾科瑞生物

目录

- **产品概述** 1
- **产品组成** 1
- **保存及运输** 1
- **实验原理及流程** 1
- **产品优势** 3
- **使用注意事项** 3
- **实验前准备** 3
- **操作方法** 4

A. **探针杂交** 4

B. **RNase H 消化** 4

C. **DNase I 消化** 5

D. **RNA 纯化** 5

➢ 产品概述

本产品是基于 RNase H 法去除人、小鼠和大鼠来源的 Total RNA 中核糖体 RNA（ribosomal RNA, rRNA）的试剂盒，能有效去除 10 ng ~ 1 μg Total RNA 中的细胞质 rRNA（包括 5S rRNA、5.8S rRNA、18S rRNA 和 28S rRNA）和线粒体 rRNA（12S rRNA 和 16S rRNA），对高质量 RNA 与低质量 RNA 样本（如 FFPE 样本）均能获得较好的去除效果。通过本产品获得的 RNA 可用于 mRNA 及非编码 RNA（lncRNA）的分析，如可搭配本公司产品 *AccuNext* 链特异性 RNA 文库制备试剂盒（Illumina）（Code No. AG12503 / AG12504）构建二代测序 RNA 文库。

➢ 产品组成

组分名称	AG12718 （4 rxns）	AG12719 (12 rxns)
10X Hybridization Buffer	6 μl	18 μl
rRNA Probe Mix（H / M / R)	12 μl	36 μl
RNase H	8 μl	24 μl
RNase H Buffer	12 μl	36 μl
DNase I	20 μl	60 μl
DNase I Buffer	20 μl	60 μl
Nuclease free water	1 ml	1 ml

注意：本产品中不含有纯化磁珠，需要自备。本公司产品 *MagSpherix* DNA 磁珠（Code No. AG12546 / AG12547 / AG12548）已经过验证，可搭配使用。

➢ 保存及运输

保存温度：−20℃ 保存

运输温度：干冰运输或 −20℃ 冰袋运输

➢ 实验原理及流程

将人、小鼠或大鼠的 Total RNA 与 rRNA Probe Mix（H / M / R)混合，通过退火反应使 rRNA Probe Mix（H / M / R)与 rRNA 特异性杂交结合；通过 RNase H 剪切消化与 DNA probe 杂交的 rRNA，DNase I 消化去除 rRNA Probe Mix（H / M / R)，最后使用磁珠回收获得去除了 rRNA 的 RNA。具体原理过程如图 1 所示：

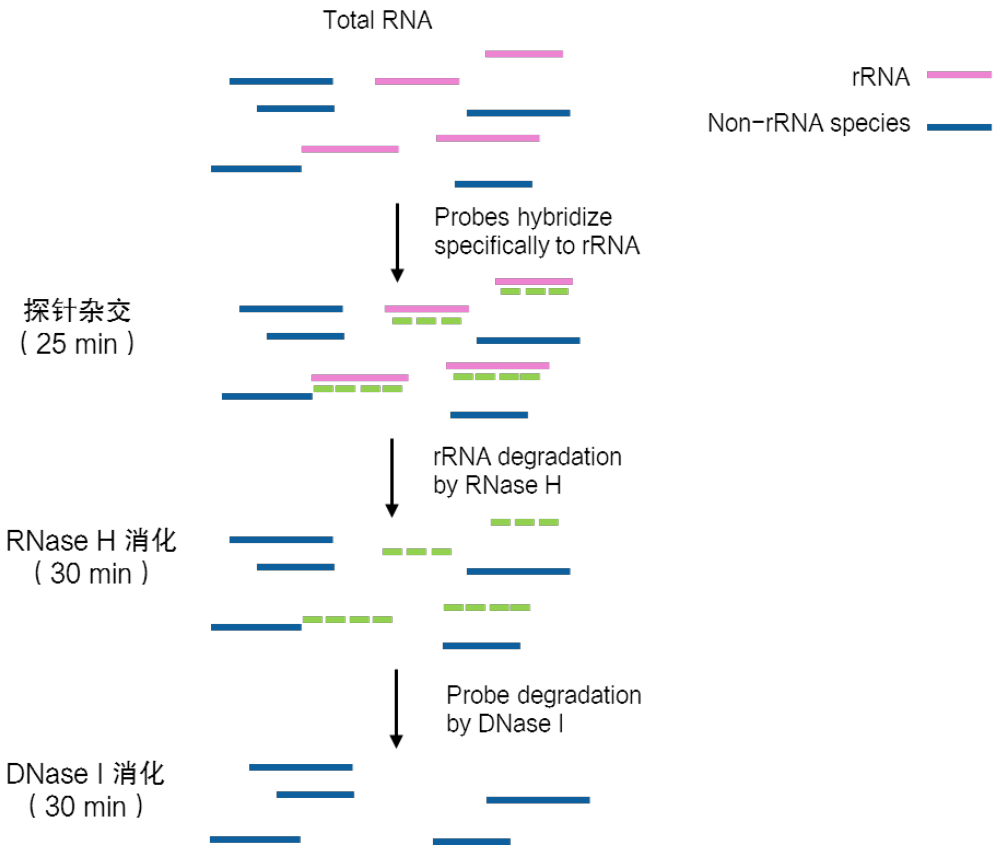

图 1：实验原理

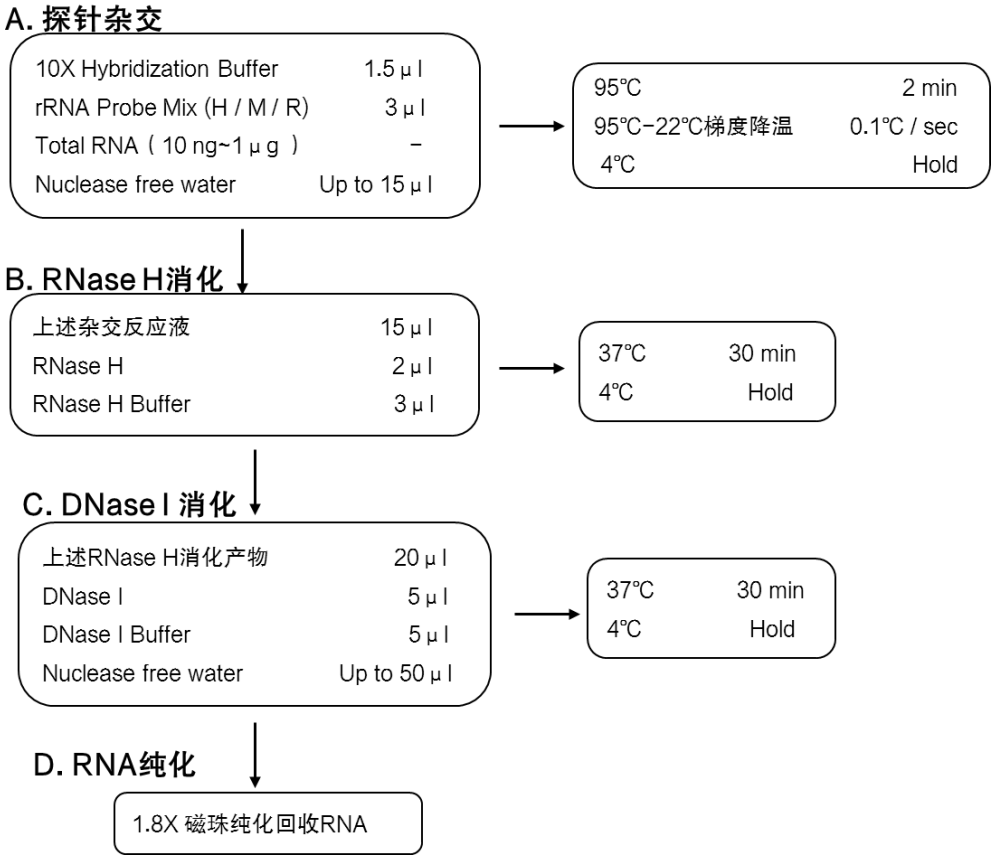

图 2：实验流程图

➢ 产品优势

1. 高效去除人、小鼠、大鼠 RNA 中的 rRNA。
2. 可去除细胞质 rRNA（包括 5S rRNA、5.8S rRNA、18S rRNA、28S rRNA）和线粒体 rRNA（12S rRNA 和 16S rRNA）。
3. RNA 投入量适用范围广：适用于 10 ng ~ 1 μg Total RNA。
4. 能够兼容部分降解的 RNA（如 FFPE 样本）。
5. 超快速实验流程：仅需 2 小时即可完成实验。

➢ 使用注意事项

1. 防污染要求

- ❖ 本实验全程都要防止 RNase 污染，使用 RNase-free 的耗材与试剂。
- ❖ 实验过程中，要穿实验服、戴一次性的口罩和手套，防止 RNase 污染。
- ❖ 本产品中的试剂，应保存在无 RNase 和核酸污染的环境中，避免试剂被污染。
- ❖ 要避免与其他实验的交叉污染。建议将实验区分区：试剂配制区（建议设置无菌正向气流）、模板添加区、产物纯化区和电泳检测区。
- ❖ 实验过程中要避免讲话，每次实验前后使用 70%酒精擦拭清洁实验台面。实验过程中小心轻柔地打开和关闭样品管盖，避免样品飞溅或喷洒。若样品飞溅至手套，建议更换手套；若喷洒至桌面，立即用水或 70%的酒精擦拭。

2. RNA 要求

- ❖ RNA 完整性：本产品适用部分降解的 RNA，但如果后续应用需要了解 RNA 的 RIN 值情况（比如做 RNA-seq 时需要根据 RIN 值确定 RNA 片段化时间），建议在实验前对 Total RNA 进行 RNA 完整性检测。
- ❖ RNA 纯度：建议使用高纯度的 RNA，不要含有 DNA、DNase I、盐离子（如 Mg^{2+} 等）、有机溶剂（如苯酚、乙醇等）等杂质：若 RNA 纯度不好，可能会影响 rRNA 去除效果；如 DNA 残留会导致 RNA 定量不准确，影响探针与 rRNA 的结合；DNase I 残留，可能会导致 rRNA Probe Mix (H / M / R)降解；如盐离子等杂质可能会影响探针与 rRNA 杂交。
- ❖ RNA 纯化回收：推荐使用专门的 RNA 磁珠回收 RNA。本公司推荐使用的 *MagSpherix* DNA 磁珠（Code No. AG12546 / AG12547 / AG12548）经过验证，可同时进行 DNA 与 RNA 的回收，若是其他的 DNA 磁珠，需要进行验证。

➢ 实验前准备

1. 试剂 & 耗材：

- ❖ RNA 纯化磁珠：本公司产品 *MagSpherix* DNA 磁珠（Code No. AG12546 / AG12547 / AG12548）或其他 RNA 纯化磁珠。

- RNA 完整性检测：可通过 Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent #5067-1513) 检测 RNA 的完整性及 RIN 值。
- RNA 建库试剂盒：*AccuNext* 链特异性 RNA 文库制备试剂盒（Illumina）（Code No. AG12503 / AG12504）或其他等效产品。
- 其他：80%乙醇，0.2 ml RNase-free PCR 管，1.5 ml 离心管等。

2. **仪器：**
   - PCR 仪、Qubit 荧光计、Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer、移液器、涡旋振荡仪、小型桌面离心机、磁力架等。

➢ 操作方法

- 提前将 10X Hybridization Buffer、rRNA Probe Mix（H / M / R）、RNase H Buffer、DNase I Buffer 室温解冻，混匀后短暂离心。RNase H 和 DNase I 用移液器轻柔的吹打混匀后，放在冰上备用。

A. 探针杂交

按照下表在冰上配制杂交反应液，用移液器吹打混匀。

组分	反应体系
10X Hybridization Buffer	1.5 μl
rRNA Probe Mix (H / M / R)	3 μl
Total RNA（10 ng~1 μg ）	-
Nuclease free water	up to 15 μl

将上述 PCR 管置于 PCR 仪中进行探针杂交反应，反应结束后立即置于冰上。

温度	时间
95℃	2 min
95℃~22℃ 梯度降温	0.1℃ / sec
22℃	2 min

B. RNase H 消化

按照下表在冰上配制 RNase H 消化反应液，用移液器吹打混匀。

组分	反应体系
上述杂交反应液	15 μl
RNase H	2 μl
RNase H Buffer	3 μl

将上述 PCR 管置于 PCR 仪中进行 RNase H 消化反应，反应结束后立即置于冰上。

温度	时间
37℃	30 min
4℃	Hold

C. DNase I 消化

1. 按照下表在冰上配制 DNase I 消化反应液，轻柔混匀后放置于冰上备用。

组分	反应体系
上述 RNase H 消化产物	20 μl
DNase I	5 μl
DNase I Buffer	5 μl
Nuclease free water	20 μl

将上述 PCR 管置于 PCR 仪中进行 DNase I 消化，反应程序如下：

温度	时间
37℃	30 min
4℃	Hold

2. 反应结束后，产物可短暂保存于-80℃，为避免 RNA 降解，应立即进行 < D. RNA 纯化 > 步骤。

D. RNA 纯化

本产品中不含有 RNA 纯化磁珠，推荐使用 1.8X 磁珠进行纯化，以下步骤是以 *MagSpherix* DNA 磁珠（Code No. AG12546）为例。若使用其他磁珠，建议摸索比例。

实验前准备：

- 每次实验前，可根据实验量，配制新鲜的 80%乙醇溶液，每个样品需要 400 μl。
- 实验前，将磁珠恢复至室温（15 ~ 25℃）（放置约 30 min），使用前将磁珠充分涡旋振荡混匀约 5 min。

实验步骤

1. 加入 90 μl *MagSpherix* DNA Beads 于 50 μl 产物中（磁珠：样品的比例为 1.8：1），涡旋混匀 5 ~ 10 sec 或使用移液器轻柔吸打混匀 10 次，充分混匀后，短暂离心，室温静置孵育 5 min。
2. 将 PCR 管置于磁力架上，待溶液澄清后（约 2~5 min），小心移除上清（勿吸到磁珠）。
3. 保持 PCR 管始终处于磁力架上，加入 200 μl 80%乙醇漂洗，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
4. 重复步骤 3 一次。
5. 保持 PCR 管始终置于磁力架上，开盖干燥磁珠 3 ~ 5 min 至无乙醇残留。
(注意：无乙醇残留时，磁珠表面无光泽；如果乙醇未干燥完全，可能会影响 RNA 的洗脱效率及影响下游实验。但注意不要过分干燥磁珠，避免磁珠表面开裂，降低 RNA 洗脱效率。)

6. 磁珠晾干后，将 PCR 管从磁力架上取下，加入 11μl Nuclease free water 覆盖磁珠（可根据后续实验调整 Nuclease free water 加入量），使用移液器吹打 10 次充分混匀磁珠，室温孵育 5 min（如果磁珠干燥开裂，适当延长孵育时间）。
7. 将 PCR 管短暂离心，置于磁力架上，直到溶液澄清 (2 ~ 5 min)。
8. 小心吸取 10μl（根据步骤 6 中 Nuclease free water 加入量调整）上清转移到新的 PCR 管中（勿吸到磁珠）。
9. RNA 保存于-80℃或者立即进行下游实验。