

# Ribo-off™ rRNA Depletion Kit (Human/Mouse/Rat)

N406-01/02

Version 5.1



Vazyme biotech co., Ltd.

## 产品简介

Ribo-off™ rRNA depletion kit (H/M/R) 适用于去除人、小鼠和大鼠总RNA中的rRNA (包括细胞质28S, 18S, 5S rRNA以及线粒体12S, 5.8S rRNA), 保留mRNA以及其它非编码RNA; 该试剂盒同时适用于完整的和部分降解的RNA样本 (例如FFPE RNA), 得到的rRNA-depleted RNA可用于mRNA和非编码RNA (例如lncRNA) 分析。

## 产品组成

组 分	N406-01 (24rxn)	N406-02 (96rxn)
rRNA Probe (H/M/R)	24 µl	96 µl
Probe Buffer	72 µl	288 µl
RNase H Buffer	96 µl	384 µl
RNase H	24 µl	96 µl
DNase I Buffer	696 µl	4 × 696 µl
DNase I	24 µl	96 µl
Nuclease-free水	1 ml	4 ml

## 储存条件

-20 °C保存。

## 其他必需材料

磁力架

100%乙醇

Nuclease-free PCR管

Agencourt® RNAClean® XP (Beckman #A63987)

## 适用范围

起始模板:

0.1-1 µg人、小鼠、大鼠总RNA。

## 使用方法

1. 准备总RNA样品:

1.1. 在一个Nuclease-free PCR管中, 用Nuclease-free水将0.1-1 µg总RNA稀释至11 µl, 冰上放置备用。

2. RNA样品与探针杂交:

2.1. 在一个Nuclease-free PCR管中配制如下反应液:

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. 瞬时离心将样品收集至管底, 将样品置于PCR仪中, 按以下程序操作, 总共耗时约15-20分钟。

95 °C	2 min
95-22 °C	0.1 °C/sec
22 °C	5 min

2.3. 瞬时离心将样品收集至管底, 并置于冰上, 立即进入下一步操作。

### 3. RNase H消化

#### 3.1. 在冰上制备如下反应液:

RNase H Buffer	4 $\mu$ l
RNase H	1 $\mu$ l
上一步产物	15 $\mu$ l
总计	20 $\mu$ l

用移液器轻轻吹打混匀。

3.2. 将样品置于PCR仪中, 37 °C作用30分钟。

3.3. 瞬时离心将样品收集至管底, 并置于冰上, 立即进入下步操作。

### 4. DNase I消化:

#### 4.1. 在冰上制备如下反应液:

DNase I Buffer	29 $\mu$ l
DNase I	1 $\mu$ l
RNase H消化产物	20 $\mu$ l
总计	50 $\mu$ l

用移液器轻轻吹打混匀。

4.2. 将样品置于PCR仪中, 37 °C作用30分钟。

4.3. 瞬时离心将样品收集至管底, 并置于冰上, 立即进入下步操作。

### 5. 使用Agencourt® RNAClean® XP纯化Ribosomal-depleted RNA

5.1. 涡旋振荡混匀Agencourt® RNAClean® XP Beads, 吸取110  $\mu$ l (2.2  $\times$ )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  $\mu$ l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5-10分钟。

5.7A. 若纯化产物用于逆转录反应, 将样品从磁力架上取出, 加入10.5  $\mu$ l Nuclease-free水, 用移液器吹打6次以充分混匀, 室温静置2分钟。在磁力架上静置5分钟, 待溶液澄清后, 小心吸取8  $\mu$ l上清至一个新的Nuclease-free PCR管中。

5.7B. 若纯化产物用VAHTS™ Total RNA-seq (H/M/R) Library Prep Kit for Illumina®试剂盒 (Vazyme #NR603) 建库, 将样品从磁力架上取出, 加入18.5  $\mu$ l Frag/Prime Buffer, 用移液器吹打6次以充分混匀, 室温静置2分钟。在磁力架上静置5分钟, 待溶液澄清后, 小心吸取16  $\mu$ l上清至一个新的Nuclease-free PCR管中, 立即进行文库构建。

5.8. 样品可置于冰上继续进行NGS文库构建或其他分析应用 (建议立即进行后续反应), 也可置于-20 °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Mg<sup>2+</sup>或胍盐) 和有机物 (例如苯酚和乙醇)。

2. 为避免DNA污染, RNA样品用DNase I处理以去除痕量DNA。

3. 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%。

4. 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。