



TIANGEN官方微信, 专业服务助力科研:

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动



Order: 010-59822688  
Toll-free: 800-990-6057 / 400-810-6057  
TIANGEN BIOTECH (BEIJING) CO., LTD

版本号: NR180226

浓缩国际权威精华,  
铸就TIANGEN优秀品质!

TIANGEN为您提供国际化标准的生物学产品和服务

- PCR、RT-PCR系列
- 核酸DNA、RNA分离纯化系列
- DNA分子量标准
- 克隆载体、感受态细胞
- 细胞生物学产品
- 蛋白分子量标准
- 蛋白质染色、检测及定量相关产品

## TIANSeq rRNA Depletion Kit (H/M/R) TIANSeq核糖体RNA去除试剂盒(人/小鼠/大鼠)

目录号: NR101

### 产品内容

产品组成	NR101-01 (6 rxn)	NR101-02 (24 rxn)	NR101-03 (96 rxn)
Ribo Hybridization Probe (H/M/R)	6 $\mu$ l	24 $\mu$ l	4 $\times$ 24 $\mu$ l
5 $\times$ Hybridization Buffer	18 $\mu$ l	72 $\mu$ l	4 $\times$ 72 $\mu$ l
Ribo RNase H	6 $\mu$ l	24 $\mu$ l	4 $\times$ 24 $\mu$ l
5 $\times$ RNase H Buffer	24 $\mu$ l	96 $\mu$ l	4 $\times$ 96 $\mu$ l
Ribo DNase I	6 $\mu$ l	24 $\mu$ l	4 $\times$ 24 $\mu$ l
10 $\times$ DNase I Buffer	30 $\mu$ l	120 $\mu$ l	4 $\times$ 120 $\mu$ l
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	1 ml	2 $\times$ 1 ml	8 $\times$ 1 ml
rRNA Primer Mix	12 $\mu$ l	48 $\mu$ l	4 $\times$ 48 $\mu$ l
mRNA Primer Mix	12 $\mu$ l	48 $\mu$ l	4 $\times$ 48 $\mu$ l

### 储存条件

-20 $^{\circ}$ C 保存, 保质期为一年, 尽量避免反复冻融。

## 产品简介

TIANSeq rRNA Depletion Kit (H/M/R) 采用特殊设计的DNA探针与核糖体RNA (rRNA) 杂交, 随后利用Ribo RNase H降解DNA-rRNA杂交链中的rRNA, 从而去除人、小鼠、大鼠总RNA中的细胞质核糖体RNA (28S、18S、5.8S、5S) 和线粒体内核糖体RNA (16S、12S), 保留信使RNA (mRNA) 和其它非编码RNA。

该试剂盒对于完整和部分降解的总RNA (如FFPE RNA) 均具有良好的rRNA去除效果, 所获得的去除了rRNA的RNA样本可用于mRNA和非编码RNA高通量测序, 可显著提高测序结果中有效数据比例, 纯化产物也可用于随机引物cDNA合成或其它下游应用。

## 产品特点

**样本广泛:** 适用于高质量 (完整) 及部分降解 (如FFPE) 样本中rRNA的去除。

**高效去除:** 有效去除95~99.9%的人/小鼠/大鼠的rRNA。

**数据全面:** 保留了不完整mRNA和非编码RNA信息, 使转录组数据更加全面。

**快速评估:** 试剂盒中提供的引物可快速评估rRNA的去除效果。

## 推荐使用的其他试剂

1. 去除rRNA的RNA纯化: TIANSeq RNA Clean Beads (TIANGEN Cat#NG307)。
2. PCR检测rRNA去除效率, FastKing RT Kit (With gDNase) (TIANGEN Cat#KR116), SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) (TIANGEN Cat#FP205)。

## 注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

1. 操作过程请注意避免核酸样品和产物之间的交叉污染。
2. 请使用不含RNA酶或DNA酶的枪头、离心管进行实验。
3. 实验开始前, 请清洁操作台, 建议使用RNA酶及DNA酶清除试剂处理台面。确保没有RNA酶和DNA酶的污染。

2) 用移液器吸吹混匀并短暂离心。

3) 将各管反应样品置于定量PCR仪中, 参照下表开始进行检测:

阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1 ×	95°C	15 min	预变性	否
PCR反应	40 ×	95°C	10 sec	变性	否
		60°C	30 sec ▲	退火/延伸	是
熔解曲线分析 (Melting/Dissociation Curve Stage)					

▲ 此处以Bio-Rad CFX96 Real Time System为例, 其它定量PCR仪器请参照仪器使用说明书或SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) (TIANGEN Cat#FP205) 试剂盒说明书的建议。

3. 供参考的两步法RT-PCR结果示例:

引物	1 µg RNA样品	Ct值		
		Human	Mouse	Rat
rRNA	未经rRNA去除	9.26	7.41	8.12
Primer Mix	经rRNA去除	28.87	26.95	27.22
mRNA	未经rRNA去除	19.32	21.28	20.38
Primer Mix	经rRNA去除	19.44	21.74	20.31
rRNA去除率		99.9%	99.9%	99.9%

### 去除率计算方法:

$$\Delta Ct = Ct (\text{经rRNA去除}) - Ct (\text{未经rRNA去除})$$

$$\text{去除率} = \left(1 - \frac{1}{2^{\Delta Ct}}\right) \times 100\%$$

## 五、Real-time PCR检测（可选步骤）

本试剂盒提供两对定量PCR引物，分别为18S rRNA的rRNA Primer Mix和beta-actin的mRNA Primer Mix。建议以不进行处理的等量初始总RNA为对照（需用RNase-Free ddH<sub>2</sub>O或洗脱缓冲液稀释至洗脱体积），以评估rRNA去除效率和mRNA损失比例。

**两步法示例：**逆转录用1 μl的RNA产物作模板，合成第一链cDNA，然后定量PCR用2 μl cDNA作模板。试剂盒使用FastKing RT Kit (With gDNase) (TIANGEN Cat#KR116)和SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) (TIANGEN Cat#FP205)。

### 1. 逆转录

1) 参照下表配制基因组DNA去除反应体系，置于42℃孵育3 min，然后冰上放置。

组分名称	体积
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	12 μl
5 × gDNA Buffer	2 μl
10 × King RT Buffer	2 μl
FQ-RT Enzyme Mix	1 μl
FastKing RT Enzyme Mix	1 μl
RNA	1 μl
Total	20 μl

2) 用移液器吸吹混匀并短暂离心，置于PCR仪中（热盖99-105℃），42℃孵育15 min，随后95℃孵育3 min。

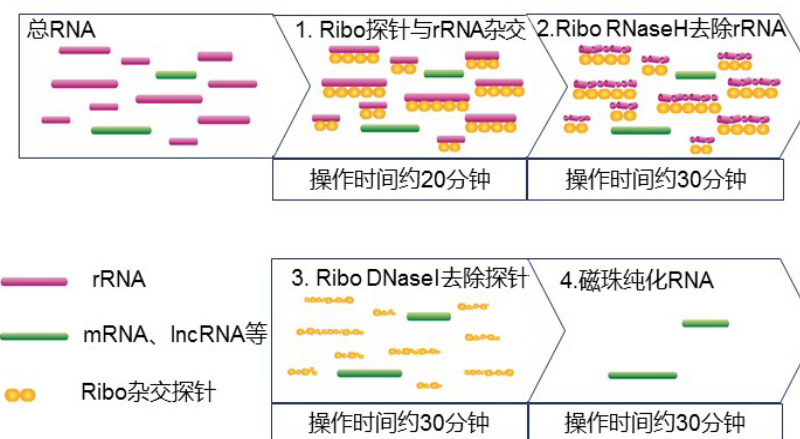
3) 取出瞬时离心，得到的cDNA可用于后续定量实验，或在-20℃保存。

### 2. 定量PCR（以Bio-Rad CFX96为例）

1) 使用Nuclease-Free PCR管，参照下表在冰上配制定量PCR反应液：

组成成分	体积
2 × SuperReal PreMix Plus	10 μl
rRNA Primer Mix或mRNA Primer Mix	1 μl
cDNA模板	2 μl
50 × ROX Reference Dye	0 μl▲
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	至20 μl

## 操作流程示意图



## 操作步骤

### 一、探针与rRNA杂交

1. 在200 μl Nuclease-Free PCR管中，用RNase-Free ddH<sub>2</sub>O将100~1000 ng人/小鼠/大鼠的总RNA稀释至11 μl，冰上放置备用。

**注意：**总RNA样品中应无DNA、盐离子（例如Mg<sup>2+</sup>、胍盐）、有机试剂（例如酚、乙醇）残留，否则可能导致非预期的RNA降解或去除效率降低。

2. 参照下表配制探针反应液：

组分名称	体积
5 × Hybridization Buffer	3 μl
Ribo Hybridization Probe (H/M/R)	1 μl
Total	4 μl

3. 将步骤2的4 μl探针反应液加入到步骤1装有11 μl RNA样品的PCR管中，用移液器吸吹混匀10次。

4. 瞬时离心，将样品置于PCR仪中（启用热盖99~105℃均可），按以下程序操作，总共耗时约20 min。

**注意：必须慢速降温(每秒降温0.1℃)，使探针与rRNA充分杂交。**

步骤	温度	时间
1	95℃	2 min
2	95 to 22 °C	0.1 °C/sec
3	22 °C	5 min hold

5. 瞬时离心，并置于冰上，立即进入下步操作。

## 二、Ribo RNase H消化rRNA

1. 参照下表在冰上配制Ribo RNase H反应液，并用移液器吸吹混匀10次。

组分名称	体积
5× RNase H Buffer	4 μl
Ribo RNase H	1 μl
Total	5 μl

2. 将5 μl Ribo RNase H反应液加入步骤一的产物中，构成20 μl反应体系，用移液器吸吹混匀10次。
3. 瞬时离心，将样品置于PCR仪中（启用热盖40℃），37℃孵育30 min。
4. 瞬时离心，将样品置于冰上，立即进入下步操作。

## 三、Ribo DNase I消化探针

1. 参照下表在冰上配制Ribo DNase I反应液，并用移液器轻轻吸吹混匀10次。

组分名称	体积
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	24 μl
10× DNase I Buffer	5 μl
Ribo DNase I	1 μl
Total	30 μl

2. 将30 μl Ribo DNase I反应液加入步骤二的产物中，构成50 μl反应体系，用移液器吸吹混匀10次。
3. 瞬时离心，将样品置于PCR仪中（启用热盖40℃），37℃孵育30 min。
4. 瞬时离心，将样品置于冰上，立即进入下步操作。

## 四、RNA纯化

推荐使用磁珠纯化产品TIANSeq RNA Clean Beads (TIANGEN Cat#NG307)，也可使用Agencourt RNAClean XP (Beckman Coulter)。

- 涡旋振荡混匀TIANSeq RNA Clean Beads，吸取110 μl（2.2倍体积）至步骤三的50 μl RNA产物，用移液器吸吹混匀10次。
- 冰上静置15 min，使RNA充分结合到磁珠上。
- 将样品置于磁力架上5 min，待溶液澄清后，用移液器小心移除上清。
- 保持样品始终处于磁力架上，加入200 μl新鲜配制的80%乙醇（每次实验需要新鲜配制，因为乙醇易从空气中吸收水分，浓度降低影响实验效果）漂洗磁珠（不要吹散磁珠），室温孵育30 sec，小心移除上清。
- 重复步骤4进行漂洗。
- 取出离心管短暂低速离心（<2000 g, 10 sec），使液体收集至管底，将样品放回磁力架，用移液器小心弃去所有液体。
- 保持样品始终处于磁力架上，开盖晾干磁珠3~5 min（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）。
- 将样品从磁力架上取出，加入12 μl RNase-Free ddH<sub>2</sub>O（或适合下游实验的相应体积ddH<sub>2</sub>O或洗脱缓冲液），用移液器吹打10次混匀磁珠，室温静置2 min。
- 在磁力架上静置2 min，待溶液澄清后，不要触动磁珠，小心吸取10 μl上清（可根据步骤8选择的实际洗脱体积进行相应调整，尽量充分利用洗脱产物）至新的Nuclease-Free PCR管。
- 洗脱样品可立即用于RNA测序文库构建或其他分析应用，也可在-20℃保存过夜或在-80℃保存7天。