



核糖体 RNA/珠蛋白 mRNA 去除 试剂盒(人/小鼠/大鼠) 使用说明书

货 号:

NGS24010-S(24 rxns)

NGS24010-L(96 rxns)



一、试剂盒简介

核糖体 RNA/珠蛋白 mRNA 去除试剂盒(人/小鼠/大鼠)包含可特异性结合核糖体 RNA 和珠蛋白 mRNA 的探针,有效去除人、大鼠和小鼠总 RNA 中的核糖体 RNA (包括细胞质 28S、18S、5.8S、5S rRNA, 以及线粒体 16S、12S rRNA),此外还可特异性去除人总 RNA 中的 45S ETS、ITS rRNA 及珠蛋白 mRNA(HBA1/2、HBB、HBD、HBM、HBG1/2、HBE1、HBQ1、HBZ),产物可以用于 RNA 文库构建或者其他核糖体去除分析。本产品不仅适用完整性较好的 RNA 样本,也适用于发生降解的 RNA 样本。试剂盒适用模板投入量为 0.1-1 μg ,且提供的所有试剂都经过了严格的质量控制和功能验证,最大程度上保证了文库构建的稳定性和重复性。

二、试剂盒规格及组分

	组分名称	NGS24010-S (24 rxns)	NGS24010-L (96 rxns)	保存温度
Box1	核糖体 RNA/珠蛋白 mRNA 去除探针 (人/小鼠/大鼠)	48 μL	192 μL	-25~-15 $^{\circ}\text{C}$
	探针反应液	72 μL	288 μL	-25~-15 $^{\circ}\text{C}$
	RNase H	12 μL	48 μL	-25~-15 $^{\circ}\text{C}$
	10 $\times$ RNase H 缓冲液	48 μL	192 μL	-25~-15 $^{\circ}\text{C}$
	DNase I	24 μL	96 μL	-25~-15 $^{\circ}\text{C}$
	10 $\times$ DNase I 缓冲液	72 μL	288 μL	-25~-15 $^{\circ}\text{C}$
Box2	RNA 纯化磁珠	720 μL	1.44 mL $\times$ 2	2~8 $^{\circ}\text{C}$

三、保存与运输条件

Box1: -25 ~ -15 $^{\circ}\text{C}$ 保存,干冰运输。

Box2: 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 保存,冰袋运输。

四、自备材料

磁力架、无核酸酶 200 μL PCR 单管或者八联排管、80%乙醇、无核酸酶水(Nuclease-free Water)等。

五、注意事项

5.1 为保证核糖体 RNA 去除效率,应确保 RNA 样品中无盐离子(例如 Mg^{2+} 、胍盐)和有机物(例如苯酚或乙醇)。

5.2 纯化磁珠使用前应平衡至室温。

5.3 操作过程中,使用不含 DNA 酶或者 RNA 酶的枪头、离心管进行操作。

5.4 实验过程中务必佩戴口罩、手套进行操作,并使用新鲜的无核酸酶水(Nuclease-free Water),避免污



染。

- 5.5 操作过程中，RNA 样本放置于冰上，并尽快进行后续实验，避免 RNA 降解。
- 5.6 本试剂盒仅供科研使用，使用前请详细阅读说明书并必须严格按照说明书进行操作。
- 5.7 避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样品时请更换枪头。
- 5.8 反应液配置时应尽量避免产生气泡，并注意防止漏液。
- 5.9 不要使用超过有效期的试剂，不同批次的产品不能混用。
- 5.10 加样所用的移液器需要定期检测，保证加样的准确性。

六、操作步骤

6.1 样本准备

将 RNA 取出置于冰上溶解，用无核酸酶水(Nuclease-free Water)将 0.1-1 μg 总 RNA 稀释至 10 μL ，置于无核酸酶 PCR 管(Nuclease-free PCR 管)中，冰上放置备用。

6.2 RNA 与探针反应

6.2.1 将探针反应液和核糖体 RNA/珠蛋白 mRNA 去除探针(人/小鼠/大鼠)室温解冻，震荡混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.2.2 配置表 1 中的体系：

表 1 探针反应混合液体系

试剂	体积
核糖体 RNA/珠蛋白 mRNA 去除探针 (人/小鼠/大鼠)	2 μL
探针反应液	3 μL
Total	5 μL

注：探针反应液可以按照 1.1 倍配置，再分装至稀释好的 RNA 中。

6.2.3 吸取 5 μL 探针反应混合液加入稀释好的 RNA 中，移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心。

6.2.4 将上述体系置于 PCR 仪中（热盖温度 105 $^{\circ}\text{C}$ ），使核糖体 RNA/珠蛋白 mRNA 去除探针(人/小鼠/大鼠)与 RNA 进行反应。

表 2 探针反应程序

温度	时间
95 $^{\circ}\text{C}$	2 min
95-22 $^{\circ}\text{C}$	0.1 $^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ ，匀速降温至 22 $^{\circ}\text{C}$
22 $^{\circ}\text{C}$	5 min

6.2.5 反应结束后，将样本从 PCR 仪中取出，置于冰上，立即进行 RNase H 消化。

6.3 RNase H 消化

6.3.1 提前将 10 $\times$ RNase H 缓冲液室温解冻，震荡混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.3.2 将 RNase H 置于冰上解冻，轻弹混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.3.3 配置表 3 中的体系：

表 3 RNase H 反应液体系

试剂	体积
Nuclease-free Water	2.5 μ L
10 $\times$ RNase H 缓冲液	2 μ L
RNase H	0.5 μ L
Total	5 μ L

注：RNase H 反应液可以按照 1.1 倍配置，再分装至各样本中。

6.3.4 将表 3 中的 RNase H 反应液吹打混匀，向探针反应结束后的体系中加入 5 μ L RNase H 反应液，按照表 4 进行反应，进行 RNase H 反应(热盖温度 45 $^{\circ}$ C)：

表 4 RNase H 反应程序

温度	时间
37 $^{\circ}$ C	30 min

6.3.5 RNase H 反应结束后，立即取出 PCR 管置于冰上，立即进行 DNase I 消化。

6.4 DNase I 消化

6.4.1 提前将 10 $\times$ DNase I 缓冲液室温解冻，震荡混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.4.2 将 DNase I 置于冰上解冻，轻弹混匀，短暂离心后置于冰上备用。

6.4.3 配置表 5 中的体系：

表 5 DNase I 反应液体系

试剂	体积
Nuclease-free Water	6 μ L
10 $\times$ DNase I 缓冲液	3 μ L
DNase I	1 μ L
Total	10 μ L

注：DNase I 反应液可以按照 1.1 倍配置，再分装至 RNase H 反应结束后的 PCR 管中。

6.4.4 将表 5 中的 DNase I 反应液吹打混匀，向 RNase H 消化反应结束后的体系中加入 10 μ L DNase I 反应液，按照表 6 进行反应，进行 DNase I 反应(热盖温度 45 $^{\circ}$ C)：

表 6 DNase I 反应程序

温度	时间
37 $^{\circ}$ C	30 min

6.4.5 DNase I 反应结束后，立即取出 PCR 管置于冰上，立即进行 RNA 纯化。

6.5 核糖体 RNA/珠蛋白 mRNA 去除后的 RNA 样本纯化

6.5.1 将 RNA 纯化磁珠由冰箱中取出，室温平衡约 30 min。配制 80%乙醇。

注：配制 80%乙醇时使用无核酸酶水(Nuclease-free Water)，以防 RNA 降解。

6.5.2 涡旋振荡或使用移液器吸吹将 RNA 纯化磁珠混匀。

6.5.3 向 DNase I 反应结束后的产物中加入 30 μL (1 $\times$) RNA 纯化磁珠，使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温孵育 5 min。

6.5.4 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后(约 5 min)，小心移除上清，注意不要吸到磁珠。

6.5.5 保持 PCR 管始终放置于磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。

6.5.6 重复步骤 6.5.5。

6.5.7 将 PCR 管短暂离心后置于磁力架上，使用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，干燥至磁珠表面呈现哑光。

6.5.8 RNA 洗脱：

a. 若纯化产物用于 RNA 建库反应(环球基因试剂盒，货号 NGS24011)，则加入 18 μL 片段化缓冲液，使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 2 min，磁力架上 1 min，待溶液变澄清，小心吸取 16 μL 上清液至另一新的 PCR 管中，立即进行文库构建。

b. 若产物用于逆转录反应，从磁力架上取下样品，加入 10 μL 无核酸酶水(Nuclease-free Water)，使用移液器轻轻吹打充分混匀。将样品置于 PCR 仪中 80 $^{\circ}\text{C}$ 2 min 后，立即置于磁力架上静置 3 min，待溶液澄清后，小心吸取 8 μL 上清至新的 Nuclease-free PCR 管中。

注：纯化产物可置于冰上继续进行相应分析应用（建议立即进行后续反应），也可置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

七、免责声明

试剂盒仅供研究使用，不得用于临床实验或人体实验，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。严格按照说明书操作，实验者违反说明书操作，后果由实验者承担。