



北京启衡星生物科技有限公司
BEIJING FOREVERSTAR BIOTECH CO.,LTD.

StarPure ribo-Pools /riboseq-Pools (启衡星核糖体RNA去除试剂盒)

产品简介:

植物、动物和微生物的总RNA中核糖体RNA(rRNAs)的占比通常高达90%以上。为了对mRNA和非编码RNA等与科学问题相关的RNA进行灵敏及经济的检测，在进行RNA测序建库之前，应将rRNA进行去除。

启衡星研发设计的StarPure rRNA depletion Pools (SP-ribo-Pools)为RNA-seq研究提供了高效的，高性价比的，超级灵活的rRNA除去解决方案，可以为研究者提供任意物种的rRNA去除试剂盒。SP-ribo-Pools 的整个操作流程可在70分钟内完成，无酶切反应，兼容高通量自动化。由于不依赖poly A的选择，它可以用于非多聚腺苷化RNA的分析，包括非编码RNA、组蛋白及原核生物的RNA测序分析。

产品特点:

- 探针杂交捕获方式去除，无酶促反应，不会对感兴趣的RNA进行非特异降解；
- 实验流程简单，匹配自动化，节省时间；
- 优化的探针设计，rRNA覆盖全面，且无脱靶效应。

试剂盒组分:

组分编号	组分名称	4 reaction Kit	24 reaction Kit	96 reaction Kit
PM	Probe Mix	13.5 μ L	80 μ L	317 μ L
HB	Hybridization buffer	25 μ L	150 μ L	600 μ L
DB	Depletion buffer	800 μ L	4.6 mL	18.5 mL
SMB	Streptavidin-coated magnetic beads	176 μ L	1056 μ L	4.23 mL
PB [#]	Purification beads	795 μ L	4.75 mL	19 mL
SA*	Sodium acetate, 3M	45 μ L	290 μ L	1.1 mL
LA*	Linear acrylamide	10 μ L	30 μ L	110 μ L

注：#仅在SP-ribo-Pool试剂盒中包含，*仅在SP-riboseq-Pool试剂盒中包含。



存储说明:

试剂盒放置2-8°C存储, 探针-20°C保存。

材料准备(试剂盒中不提供):

- 磁力板或磁力架
- 温控模块或热循环仪
- RNase 抑制剂 (可选)
- 无菌低吸附枪头
- 96 孔 PCR 板及封板膜
- 常见的实验室设备-台式离心机, 漩涡仪, 移液器
- 100% 乙醇
- 个人防护设备-实验服, 手套

注意事项:

- Input RNA 无DNA污染
- RNA input 量可从 10 ng-1000 ng (推荐Drop定量。注: 当使用细菌、原核、真菌通用型 rRNA 去除试剂盒V1 进行rRNA去除时, 总RNA的input量不要超过200 ng, 推荐使用100ng; 当使用细菌、原核、真菌通用型rRNA去除试剂盒V2去除rRNA时, 总RNA的input量不要超过400 ng, 推荐使用200ng)。
- 在操作过程中, 避免让RNA管盖开封(孵育的时候)或长时间处于室温状态。
- 采取必要的预防措施以避免RNase污染, 如保持工作区域清洁, 戴手套, 不要在开口管上方讲话或工作。
- rRNA去除后, 由于 rRNA的高丰度, 预计损失 $\geq 95\%$ 初始RNA量。1 μg 投入RNA的预期产率 $< 50 \text{ ng}$ 。
- 使用前将所有试剂平衡至室温。
- 使用前磁珠需彻底混匀。

实验操作流程:

- 杂交前, RNA 样本应保持冰上放置。

1. 将探针 (Probe Mix) 涡旋混匀, 快速离心使管壁液滴收集到管底。

2. 探针、RNA样品杂体系配置:

将12 μL 的RNA 样品加入PCR管或者PCR板中, (包含10 ng - 1000 ng的total RNA, 注: 当用细菌、原核、真菌通用型rRNA去除试剂盒V1去除rRNA时, 总RNA的input量不要超过200ng, 推荐使用100ng的总RNA进行rRNA去除处理; 当用细菌、原核、真菌通用型rRNA去除试剂盒V2去rRNA时, 总RNA的input量不要超过400ng, 推荐使用200ng的总RNA进行rRNA去除处理), 如果样品体积 $> 12 \mu\text{L}$, 则相应调整HB的体积, 使HB体积为总体积的0.25 \times 。总反应体积不能超过40 μL 。按下表进行体系配置:

组分	体积
Total RNA	12 μL (最多)
PM	3 μL
HB	5 μL
RNase抑制剂 (可选) *	根据厂商说明添加
无核酸酶水	至20 μL

*按照制造商的用量说明，确保酶在68°C时具有活性。在磁珠准备过程中也可以加入RNase抑制剂。

3. 涡旋混匀并瞬时离心，收集管壁的液滴。

4. 将混合好的样本放PCR仪中进行杂交反应，杂交反应程序设置如下：

步骤	温度 (热盖105°C)	时间
RNA变性	68°C	10 min
退火	68°C-37°C	0.1°C/s的降温速率
-	37°C	到37°C立即进行第6步操作

5. 准备链霉亲和素磁珠——SMB

5.1 涡旋振荡使链霉亲和素磁珠充分悬浮，不要离心，以防磁珠沉降。

5.2 每个样品取40 μL 重悬好的磁珠到一个新的EP管中。对于多个样品所需SMB磁珠的清洗，可一起进行，如将6个(240 μL)或12个样品(480 μL)的磁珠分装在一个管中进行清洗。

5.3 将管子放在磁力架上，静置直到溶液变清澈（此处因磁力架性能不同，时间会有差异，Thermo磁力架(货号：12321D)约2min）。

5.4 去掉所有的上清液。

5.5 每个样品添加80 μL 的DB (如6个样品添加480 μL ，12个样品添加960 μL)，涡旋彻底混匀。

5.6 重复 5.3 到 5.5 步骤。

6. rRNA去除

6.1 将步骤4中的杂交样品 (~20 μL)，瞬离后，每个样品加入 80 μL 准备好的链霉亲和素磁珠 (步骤5)，充分混匀。

6.2 室温孵育15 min，中间每5min震荡混匀一次，随后放PCR仪上50°C孵育 5 min。

步骤	温度	时间
1	室温	15 min
2	50°C (热盖105°C)	5 min
3	第二步反应结束后立即进行下一步操作	



6.3 反应结束后立即将样品管放置磁力架上静置，直到溶液变清澈（此处因磁力架性能不同，时间会有差异，Thermo磁力(货号：12321D)架约2min），小心将上清液转移到新的管中。

6.4 将样品放在磁力架上直到溶液变清澈，以去除微量残留的磁珠(建议)。

6.5 小心地取96 μ L上清液转移到新的管中(建议)。

建议操作步骤 6.4 和 6.5 去除可能吸到的痕量磁珠，但非必须项。

此时，RNA可以在-20 $^{\circ}$ C下保存一夜，或在-80 $^{\circ}$ C下保存一个月。★安全停止点

7. RNA 纯化回收

tRNA去除后的RNA样本必须在文库制备之前进行纯化，以去除盐和缓冲液浓缩物。纯化方法的选择可以采用过柱纯化，磁珠纯化以及乙醇沉淀的方式进行纯化。SP-ribo-Pools试剂盒包含磁珠的纯化模块，而SP-riboseq-Pools试剂盒包含的是乙醇沉淀试剂模块，乙醇沉淀可回收小片段及大片的RNA，包括tRNAs、miRNAs、mRNA和大的非编码RNA，适用于Riboseq实验。

而过柱或磁珠的RNA纯化方式可以回收>90 nt的RNA片段（取决于所使用的特定缓冲条件），而小片段的 tRNAs和small RNAs会丢失。因此，应根据实际的实验需求选择相应的纯化方式。

基于磁珠法的RNA纯化流程

1. 添加 180 μ L 的重悬好的纯化磁珠 (PB)（使用前室温平衡 30 min）到步骤6的样品中 (~100 μ L)，充分混匀。
2. 室温静置5 min。
3. 将样品管放置磁力架上，静置3-5 min，直至溶液彻底变清。
4. 去掉上清液。
5. 样品管保持在磁力架上，加入200 μ L新鲜配制的 80%乙醇（乙醇液面要覆盖磁珠，液面未能覆盖可多加80%乙醇），静置30s。
6. 去掉上清液，重复洗涤一次。
7. 瞬离，去掉管底残余洗涤液。
8. 将样品管放置磁力架上3-10 min，使磁珠自然晾干（注意不要使磁珠表面出现裂纹，避免过度晾干，过度晾干会影响RNA的回收率）。
9. 将样品管从磁力架上取下，加入10-15 μ L的RNase-free水，并重悬混匀。
10. 室温孵育5 min。
11. 将孵育好的样品管放置磁力架上，静置 2-5 min至溶液变清澈。
12. 将含有RNA的上清液转移至一个新的管中。
13. 此时，将RNA放置-80 $^{\circ}$ C保存。

基于乙醇沉淀的RNA纯化流程

1. 添加10 μ L 的3M 醋酸钠 (SA) 到步骤6的样品中 (~100 μ L)；
2. 添加1 μ L 的丙烯酰胺 (LA)；



3. 涡旋混匀;
4. 添加333 μL 的无水乙醇;
5. 涡旋混匀;
6. -80°C 放置30 min 或者 -20°C 过夜;
7. 11000 g (or 最高速), 4°C 离心 30 min ;
8. 小心去除上清液, 确保吸头不要碰到沉淀;
9. 添加200 μL 70% 乙醇清洗沉淀;
10. 11000 g (or 最高速), 4°C 离心 5 min ;
11. 小心去除上清液, 确保吸头不要碰到沉淀;
12. 重复乙醇清洗步骤 (步骤 9 到 11);
13. 室温晾干沉淀5 min;
14. 加 10 μL RNase-free水 or 其他合适的洗脱 Buffer 溶解RNA, -80°C 保存。

北京启衡星生物科技有限公司

地址: 北京市昌平区生命园西环路21号楼南楼三层

网址: www.qihengxing.com

电话: 010-62149251

邮箱: sales@qihengxing.com marketing@qihengxing.com

support@qihengxing.com



扫码关注

了解更多产品信息

本产品仅供研究, 不做为临床诊断使用

版本号: V1