

**Ribo-off® rRNA Depletion Kit
(Bacteria)**

N407



使用说明书

Version 21.1

目录 Contents








01/产品概述	02
02/产品组分	02
03/保存条件	02
04/适用范围	02
05/自备材料	02
06/注意事项	03
07/实验原理与流程概要	04
08/实验流程	05
08-1/rRNA与探针杂交	05
08-2/RNase H消化	05
08-3/DNase I消化	06
08-4/纯化Ribosomal-depleted RNA	06
09/常见问题与解决方案	07

*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

01/产品概述

Ribo-off rRNA Depletion Kit (Bacteria) 是针对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌总RNA中去除rRNA的试剂盒。本试剂盒适用于起始模板量为0.01 - 5 µg的革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌总RNA，总RNA样本经过rRNA与探针杂交、RNase H消化、DNase I消化等步骤，最终将rRNA(包括16S和23S rRNA)从总RNA中去除，保留mRNA和其它非编码RNA，可用于LncRNA等非编码RNA的分析；该试剂盒同时适用于完整的和部分降解的RNA样本，所得的产物适用于RNA文库构建及其他实验。

02/产品组分

组分	N407-01 (12 rxns)	N407-02 (24 rxns)
 rRNA Probe(Bacteria)	24 µl	48 µl
 Probe Buffer	36 µl	72 µl
 RNase H Buffer	48 µl	96 µl
 RNase H	12 µl	24 µl
 DNase I Buffer	348 µl	696 µl
 DNase I	12 µl	24 µl
 RNase-free ddH ₂ O	1 ml	2 × 1 ml

▲产品组分表中标注的颜色代表各组分管盖颜色。

03/保存条件

-30 ~ -15°C保存，≤0°C运输。

04/适用范围

Ribo-off rRNA Depletion Kit (Bacteria) 适用于起始模板量为0.01 - 5 µg的革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌总RNA的rRNA(包括16S和23S rRNA)去除，保留mRNA和其它非编码RNA。同时适用于完整的和部分降解的RNA样本，所得的产物适用于RNA文库构建及其他实验。不同样品的总RNA中mRNA的含量差异较大，根据下游的应用，可以适当调整总RNA的起始投入量。

所得产物可选用VAHTS Universal V6 RNA-seq Library Prep Kit for Illumina (Vazyme #NR604)、VAHTS Universal V8 RNA-seq Library Prep Kit for Illumina (Vazyme #NR605) 进行文库构建。

05/自备材料

RNA质控: Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent #5067-1513);

RNA纯化磁珠: 可以选择VAHTS RNA Clean Beads (Vazyme #N412) 或Agencourt RNA Clean XP Beads (Beckman #A63987);

建库试剂盒: VAHTS Universal V6 RNA-seq Library Prep Kit for Illumina (Vazyme #NR604)。

其他材料: 80%乙醇 (RNase-free ddH₂O新鲜配制)、RNase-free ddH₂O; Nuclease-free PCR管、低吸附EP管 (Eppendorf #022431021); Agilent 2100 Bioanalyzer或其他等效产品、PCR仪、磁力架等。

06/注意事项

1. 试剂盒各组分应于标注条件下保存

- 试剂盒中包含多种酶, 必须于-30 ~ -15°C保存, 使用时应置于冰上, 使用后及时按条件保存, 否则可能降低酶的活性。
- 为避免反复冻融或长期使用后酶活下降, 建议在首次使用后将剩余试剂小份分装保存。

2. RNA样品操作注意事项

- RNA用RNase-free ddH₂O稀释至所需体积后请勿长时间冰上放置, 避免RNA降解。
- 如果RNA的浓度过低导致初始体积>11 μl, 可以使用冻干、乙醇沉淀、过柱回收或磁珠纯化 (VAHTS RNA Clean Beads, Vazyme #N412) 等方法浓缩RNA。

3. 正确选择片段化程序

- 若所得的Ribosomal-depleted RNA用于转录组文库的构建, 建议打断条件为85°C 6 min, 按照0.65 ×/0.1 ×分选。

4. RNA纯化磁珠注意事项

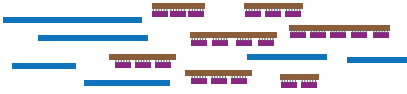
- 磁珠从2 ~ 8°C取出后应平衡至室温, 否则影响磁珠的抓取效率。
- 每次吸取磁珠前都应将其涡旋振荡充分混匀。
- 移取上清操作应在磁珠被彻底吸附 (上清澄清) 后在磁力架上小心进行, 避免吸到磁珠。
- 纯化Ribosomal-depleted RNA时, 一定要使用RNase-free ddH₂O新鲜配制的80%乙醇漂洗RNA纯化磁珠, 否则会造成RNA降解, 直接导致建库失败。
- 第二遍80%乙醇漂洗磁珠操作, 应尽量吸干上清, 减少杂质残留。
- 洗脱前应保证磁珠充分干燥 (表面由光亮褐色变为磨砂褐色), 避免乙醇残留影响后续实验, 但过分干燥 (龟裂) 将导致RNA样品损失。

5. 操作过程注意事项

- 建议使用带滤芯的吸头, 在吸取不同样品时更换吸头。
- 务必佩戴手套操作, 接触RNase-free 空间外设备或其他工作区间后, 请更换手套。
- 所有的试剂使用后务必立即盖上盖子, 避免污染。
- 酶类组分使用前进行短暂离心, 避免粘附于管壁及管盖, 造成损失。

07/实验原理与流程概要

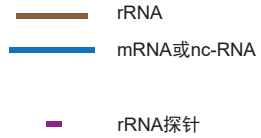
1. rRNA与探针杂交 (rRNA probe hybridization)



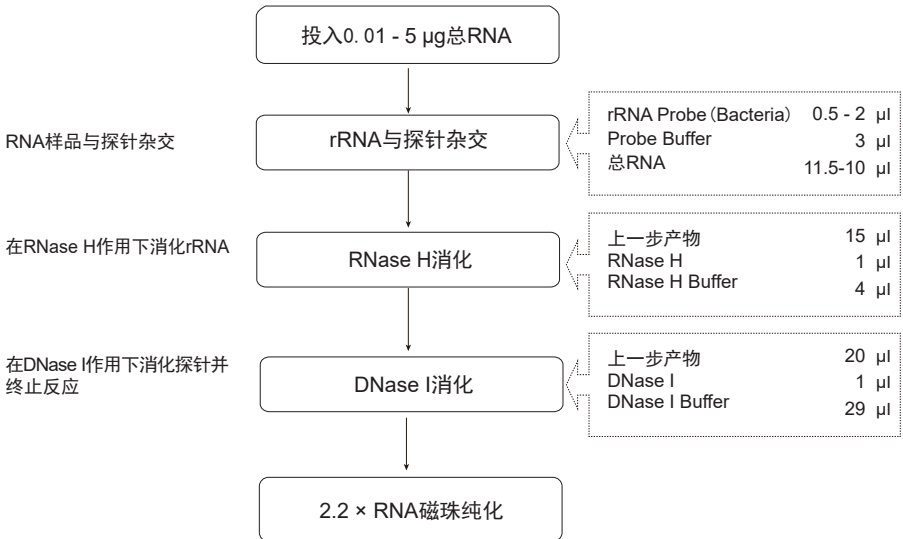
2. RNase H消化 (RNase H depletion)



3. DNase I消化 (DNase I depletion)



rRNA去除原理图



rRNA去除简易流程图

08/实验流程

08-1/RNA与探针杂交

1. 准备总RNA样品：在一个Nuclease-free离心管中，用RNase-free ddH₂O将0.01 - 5 μg总RNA稀释至相应体积（参考步骤2的反应体系），冰上放置备用。

▲可提前将下一步骤需要的组分从-30 ~ -15℃取出，冰上放置备用。

2. 在一个Nuclease-free离心管中配制如下反应液：

组分	0.01 - 0.1 μg起始	0.1 - 2.5 μg起始	2.5 - 5 μg起始	
rRNA Probe (Bacteria)	0.5 μl	1 μl	2 μl	■
Probe Buffer	3 μl	3 μl	3 μl	■
总RNA	11.5 μl	11 μl	10 μl	
Total	15 μl	15 μl	15 μl	

使用移液器轻轻吸打10次充分混匀，并短暂离心收集至管底。

▲如同时进行多个样品，可先在大小合适的离心管中预配制rRNA Probe (Bacteria) 和Probe Buffer的混合液，再分装到各PCR管中，建议按照实际反应数1.1倍配制混合液以弥补损耗。

3. 瞬时离心将样品收集至管底，将样品置于PCR仪中，进行探针杂交反应：

步骤	温度	时间
热盖On, 105℃		
RNA变性	95℃	2 min
探针杂交	95 ~ 22℃	0.1℃/sec
孵育	22℃	5 min
Hold	4℃	

▲此步骤耗时约15 - 20 min,不同型号的PCR仪可能会有差别。

▲可提前将下一步骤需要的组分从-30 ~ -15℃取出，冰上放置备用。

08-2/RNase H消化

1. 在冰上制备如下反应液：

组分	体积	
RNase H Buffer	4 μl	■
RNase H	1 μl	■
上一步产物	15 μl	
Total	20 μl	

使用移液器轻轻吸打10次充分混匀，并短暂离心收集至管底。

▲如同时进行多个样品，可先在大小合适的离心管中预配制RNase H Buffer和RNase H的混合液，再分装到各PCR管中，建议按照实际反应数1.1倍配制混合液以弥补损耗。

2. 将样品置于PCR仪中，进行RNase H消化反应：

步骤	温度	时间
热盖On, 105℃		
RNase H消化	37℃	30 min
Hold	4℃	

▲可提前将下一步骤需要的组分从-30 ~ -15℃取出，冰上放置备用。

08-3/DNase I消化

1.在冰上制备如下反应液：

组分	体积
DNase I Buffer	29 μ l ■
DNase I	1 μ l ■
上一步产物	20 μ l
Total	50 μ l

使用移液器轻轻吸打10次充分混匀，并短暂离心收集至管底。

▲如同时进行多个样品，可先在大小合适的离心管中预配制DNase I Buffer和DNase I的混合液，再分装到各PCR管中，建议按照实际反应数1.1倍配制混合液以弥补损耗。

2.将样品置于PCR仪中，进行DNase I消化反应：

步骤	温度	时间
热盖On, 105°C		
DNase I消化	37°C	30 min
Hold	4°C	

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。

08-4/纯化Ribosomal-depleted RNA

1.涡旋振荡混匀VAHTS RNA Clean Beads，吸取110 μ l (2.2 \times)至上步RNA样品中，使用移液器吹打10次以彻底混匀。

2.冰上静置15 min，使RNA结合到磁珠上。

3.将样品置于磁力架上5 min，待溶液澄清后(约5 min)，小心移除上清。

4.保持样品始终处于磁力架中，加入200 μ l **RNase-free ddH₂O**新鲜配制的**80%乙醇**漂洗磁珠，室温孵育30 sec后，小心移除上清。

5.重复步骤4一次。

6.保持样品始终处于磁力架中，在室温下开盖干燥磁珠5 - 10 min。

▲加入80%乙醇时不要吹散磁珠。

▲最后移除上清时需要使用10 μ l移液器将残留液体吸干净。

▲应避免磁珠过分干燥(龟裂)而降低回收效率。

7-1.若纯化产物用于逆转录反应，将样品从磁力架上取出，加入20 μ l RNase-free ddH₂O，用移液器吹打6次以充分混匀，在室温静置2 min。将样品置于磁力架上5 min，待溶液澄清后，小心吸取18 μ l上清至一个新的Nuclease-free PCR管中，-70°C以下储存备用。

7-2.若纯化产物用于转录组文库构建，例如VAHTS Universal V6 RNA-seq Library Prep Kit for Illumina (Vazyme #NR604)，将样品从磁力架上取出，加入18.5 μ l Frag/Prime Buffer，用移液器吹打6次以充分混匀，在室温静置2 min。将样品置于磁力架上5 min，待溶液澄清后，小心吸取16 μ l上清至一个新的Nuclease-free PCR管中，立即进行文库构建。

▲建议打断条件为85°C 6 min，分选条件为0.65 \times /0.1 \times 。

09/常见问题与解决方案

◇纯化产物可以保存多久？

纯化产物由于浓度较低容易降解，去除rRNA的样品应尽快进行下游实验，否则请-70℃以下保存。

◇如果纯化产物用于文库构建，但是使用的是RNase-free ddH₂O洗脱的，如何操作？

若条件允许，加入等体积2 × Frag/Prime Buffer (Vazyme #N402)，之后反应体系均放大，直至做到纯化步骤，恢复体系；也可以再次使用VAHTS RNA Clean Beads (Vazyme #N412) 进行纯化，最后用Frag/Prime Buffer洗脱。

◇如果纯化产物用于文库构建，打断条件和扩增循环数怎么选择？

①打断条件建议为85℃ 6 min，按照0.65 ×/0.1 ×分选；

②由于原核生物的转录本较真核生物的少，使用VAHTS Universal V6 RNA-seq Library Prep Kit for Illumina (Vazyme #NR604) 进行文库构建时，扩增循环数建议如下：

起始量	扩增循环数
2.5 - 5 μg	11 - 12
1 - 2.5 μg	13 - 14
100 - 999 ng	15 - 16
10 - 99 ng	17 - 18

◇如果文库浓度过低，可以从哪些角度去寻找原因并如何改进？

以高质量的RNA样品为模板构建得到的文库浓度都能达到上机测序要求，如果无法提供合格的RNA样品，可尝试使用以下方法弥补：

①起始量：提高样品起始量，最大可做到5 μg；

②做几个重复的样品，到二链合成纯化步骤合并在一起，或做到文库扩增前合并在一起；

③做不分选方案：94℃ 8 min打断条件下RNA片段虽然偏小，但是分布会很集中，均一性也较好。



Vazyme Biotech Co., Ltd.

Web: www.vazyme.com

Tel: 400-600-9335

Sales: sales@vazyme.com

Support: support@vazyme.com

Service: service@vazyme.com

