



## CWseq® rRNA and Globin Depletion Kit (Human/Rat/Mouse)

### CWseq® rRNA和珠蛋白mRNA去除试剂盒 (人/大鼠/小鼠)

Cat. No. CW3086S (24 rxns)  
CW3086M (96 rxns)

保存条件：-20 ± 5°C

#### 产品内容

Component	CW3086S 24 rxns	CW3086M 96 rxns
Depletion Mix	120 µL	540 µL
rRNA/Globin Probe (HMR)	70 µL	300 µL
Probe Digestion Mix	926 µL	4.2 mL

#### 产品简介

CWseq® rRNA and Globin Depletion Kit包含可特异性结合rRNA和珠蛋白mRNA的探针，有效去除人、大鼠和小鼠总RNA中的rRNA (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)。试剂盒中的每种试剂都经过了严格的质量控制，保证性能质量稳定。

## 产品应用

CWseq® rRNA and Globin Depletion Kit (Human/Rat/Mouse)适用于完整的和部分降解的RNA样本，如溶于无RNase水中的FFPE和血液衍生样品。所获得的去除了rRNA、珠蛋白mRNA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，也可用于其它cDNA下游应用。

## 适用范围

本产品适用于人、大鼠、小鼠1 ng - 1 µg 总RNA中rRNA及珠蛋白mRNA的去除。

## 自备材料

磁力架，无水乙醇、低吸附Nuclease-free PCR管，Nuclease-free ddH<sub>2</sub>O、RNA纯化磁珠。

## 注意事项

### 1. 试剂盒保存注意事项

所有组分应于-15~-25℃保存，使用前应置于冰上充分解冻。解冻后，将管颠倒数次，涡旋振荡（≥ 5 sec）以确保试剂充分混合，并尽量在开盖前短暂离心以收集液体至管底。

### 2. RNA样品准备注意事项

1) 应使用 Qubit® 荧光仪或相关仪器对 RNA 进行准确定量，总量应为1 ng - 1 µg。

2) 需确保RNA样品中无DNA污染，如有DNA污染则可通过DNase I（试剂盒中未提供）去除。去除后还需确保样品中没有残留DNase I，否则可能会干扰文库制备。

3) 需确保RNA样品中无盐离子（例如Mg<sup>2+</sup>、胍盐）、螯合剂（例如EDTA、EGTA）和有机物（例如苯酚或乙醇）残留，否则会影响rRNA和珠蛋白mRNA去除效率。

4) 为避免RNA降解，请将RNA储存在不含RNase的稀释液中，并限制样品冻融循环次数。

### 3. RNA磁珠纯化注意事项

1) 在使用前应将磁珠平衡至室温，否则影响磁珠的抓取效率。

2) 每次吸取磁珠前都应将其涡旋振荡充分混匀。

3) 漂洗时，务必使用新鲜配制的80%乙醇（Nuclease-free ddH<sub>2</sub>O配制），否则可能会造成RNA损失。

### 4. 操作过程注意事项

1) 实验开始前，请清洁操作台，建议使用康为世纪的RNase and DNA Remover (CW3141S) 或其他类似试剂处理台面，确保没有RNA酶和DNA酶污染。

- 2) 实验过程中务必佩戴口罩、手套进行操作, 并使用新鲜的Nuclease-free ddH<sub>2</sub>O, 避免污染。若手套和移液器吸头接触到未消毒的表面需及时更换。
- 3) 实验过程中所有样品管、缓冲液和酶都需置于冰上 (除非另有说明)。
- 4) 试剂使用前或制备预混液后, 需旋涡振荡将液体充分混匀, 也可使用移液器吸吹混匀, 并在开盖前短暂离心收集液体至底部。
- 5) 所有试剂使用后务必立即盖上盖子, 避免污染。

## 使用方法

### 1、rRNA和珠蛋白mRNA去除

1.1 PCR仪预热: 热盖80 °C, 77 °C HOLD。

1.2 反应液配制: 如下表在冰上进行体系配置, 在触式旋涡仪 (或3000 rpm) 上混合4 sec, 短暂离心收集液体至底部。

试剂名称	体积
Depletion Mix	4.5 μL
rRNA/Globin Probe (HMR)	2.5 μL
Total Volume	7 μL

1.3 RNA样品准备: 在200 μL Nuclease-free PCR管中, 用Nuclease-free ddH<sub>2</sub>O将1 ng - 1 μg 总RNA稀释至18 μL, 冰上放置备用。

1.4 去除体系配制: 将步骤1.2配置的反应液按下表加入到装有18 μL 总RNA样品的PCR管中, 在触式旋涡仪 (或3000 rpm) 上混合4 sec, 短暂离心收集液体至底部。

试剂名称	体积
RNA sample	18 μL
Depletion Reaction Mix (步骤1.2)	7 μL
Total Volume	25 μL

**注意:** 样品冰上放置时间应不超过10 min。

1.5 rRNA和珠蛋白mRNA去除反应: 将样品放入提前预热的PCR仪, 如下表进行反应, 反应完成后立即进入下一步。

步骤	温度	时间
变性	77 °C	2 min
rRNA去除	65 °C	15 min
HOLD	4 °C	HOLD

## 2、探针消化

2.1 PCR仪预冷: 热盖40 °C, 4 °C HOLD

2.2 消化体系配置: 冰上操作, 在步骤1.5的样品中添加35  $\mu$ L Probe Digestion Mix, 在触式旋涡仪 (或3000 rpm) 上混合4 sec, 短暂离心收集液体至底部。

2.3 探针消化反应: 将样品放入提前预冷的PCR仪, 如下表进行反应, 反应完成后立即进入下一步。

步骤	温度	时间
探针消化	37 °C	10 min
HOLD	4 °C	HOLD

## 3、RNA纯化

采用纯化磁珠进行RNA纯化 (也可使用其他类似试剂), 使用前将磁珠平衡到室温, 并涡旋彻底重悬。

3.1 将磁珠旋涡混匀后, 吸取108  $\mu$ L (1.8) 至步骤2.3的样品中, 在触式旋涡仪 (或3000 rpm) 上混合4 sec, 短暂离心收集液体至底部, 室温放置5 min。

3.2 将样品置于磁力架上5 min以上, 直至溶液澄清, 所有磁珠都吸附到管壁上, 轻柔吸弃上清。

3.3 保持样品始终处于磁力架上, 向样品中加入新鲜配制的80%乙醇, 注意不要触动磁珠。室温放置30 sec以上, 轻柔吸弃上清。

3.4 重复上一步骤, 共漂洗2次。

3.5 保持样品始终处于磁力架上, 室温下干燥3 - 5 min。

注: 当磁珠表面出现裂纹并在管内看不到液体时, 磁珠已充分干燥。

a. 若纯化产物用于RNA文库构建, 推荐按照CW3085说明书加入相应体积的Frag/Prime Buffer进行文库构建。

b. 若纯化产物用于逆转录反应, 将样品从磁力架上取出, 加入22  $\mu$ L Nuclease-free ddH<sub>2</sub>O, 用移液器吹打6次以充分混匀, 室温静置2 min。然后在磁力架上静置2 min以上, 待溶液澄清后, 小心吸取20  $\mu$ L上清至一个新的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°C保存。RNA不稳定, 易随时间推移和反复冻融而降解, 务必确保正确储存以保持RNA完整性。