

编号: H-940-001761-00



使用说明书

版本: 2.0

MGIEasy rRNA & Globin 去除试剂盒

货号: 940-001761-00 (16 RXN)
940-001760-00 (96 RXN)
试剂盒版本号: V1.3

关于说明书

©2024 深圳华大智造生物电子科技有限公司 版权所有

本说明书及其包含的信息为深圳华大智造生物电子科技有限公司（以下简称华大智造）的专有保密信息，未经华大智造的书面许可，任何个人或组织不得全部或部分地对本说明书进行重印、复制、修改、传播或公布给他人。本说明书的读者为终端用户。说明书作为产品的一部分，由华大智造授权终端用户予以使用。严禁未授权的个人使用本说明书。

华大智造对本说明书不做任何种类的保证，包括（但不限于）用于特定目的的商业性和合理性的隐含保证。华大智造已经采取措施，确保本说明书的准确性。但是，华大智造对遗漏不承担责任，并保留任何对本说明书和产品进行改进以提高其可靠性、功能或设计的权利。

本说明书中的所有图片均为示意图，图片内容可能与实物有细微差异，请以购买的产品为准。


Agilent®, Agilent Technologies™, Ambion®, Axygen®, Beckman Coulter™, Bio-Rad™, DynaMag™, Invitrogen®, NEB™, Qubit®, Thermo Fisher®, 以及文中涉及的其他名称及商标属于各自所有者资产。

制造商信息

生产企业	深圳华大智造生物电子科技有限公司
生产地址	深圳市盐田区盐田街道沿港社区北山道 146 号北山工业区 11 栋 2 楼
电话	4000-688-114
技术支持	MGI-service@mgi-tech.com
网址	www.mgi-tech.com

版本记录

说明书版本	试剂盒版本	日期	修订内容摘要
2.0	V1.3	2024 年 3 月	变更制造商信息
1.0	V1.3	2023 年 11 月	<ul style="list-style-type: none">更新试剂盒版本, 新增组分 (Human Globin Probe Mix)更新联系电话更新说明书风格
A6	V1.2	2022 年 3 月	更新公司LOGO
A5	V1.2	2021 年 1 月	更新公司联系信息
A4	V1.2	2020 年 7 月	<ul style="list-style-type: none">变更试剂盒组分装量变更公司名称为“深圳华大智造科技股份有限公司”更新说明书风格
A3	V1.1	2019 年 10 月	<ul style="list-style-type: none">产品描述中去除的 rRNA 类型增加了16 S rRNARNA 纯度要求中增加 OD_{260/230} 的要求表 FFPE 样本建库的推荐条件中增加了RNA纯化磁珠的使用量
A2	V1.1	2018 年 10 月	<ul style="list-style-type: none">修改样品起始量, 对于常规样本 (RIN\geq7) 最低可 10 ng 起始; total RNA 样本质量要求中增加了 RIN 值为 N/A 的说明去掉测序平台限制增加了产物质控步骤增加了附录, 附录中增加 total RNA 样本的 DNase I 的消化反应条件、FFPE 样本的适用条件、DV₂₀₀的计算方法以及磁珠的使用注意事项变更货号以及效期表述修改
A1	V1.1	2017 年 12 月	<ul style="list-style-type: none">修改步骤2.2中的反应体系, 由 5 μL 修改为 25 μL修改步骤2.2中的 Probe Mix 用量, 由 1 μL 修改为 2 μL修改步骤4.2中的反应体系, 由 40 μL 修改为 50 μL修改步骤5.2中的磁珠用量, 由 60 μL 修改为75 μL
A0	V1.0	2017 年 6 月	首次发布

 提示 请下载最新版说明书, 对照相应版本的试剂盒使用。

搜索货号或产品名, 下载说明书: <https://www.mgi-tech.com/download/files>

目录

1 产品信息	1
1.1 产品描述	1
1.2 适用范围	1
1.3 组分	1
1.4 储存与运输	2
1.5 自备物料清单	2
1.6 注意事项	4
1.7 流程	4

2 样本要求及处理	5
2.1 样本类型及投入量	5
2.2 Total RNA 样本质量要求	5

3 文库构建标准流程	6
3.1 探针杂交	6
3.2 RNase H 消化	8
3.3 DNase I 消化	9
3.4 RNA 的纯化	10
3.5 产物质检	11

4 附录	12
4.1 关于 RNA 样本的 DNase I 消化	12

1 产品信息

1.1 产品描述

MGIEasy rRNA & Globin 去除试剂盒适用于 10 ng ~ 1 μ g 的人血液 total RNA 样品中 **rRNA**（包括细胞质 5 S rRNA、5.8 S rRNA、18 S rRNA、28 S rRNA，线粒体 12 S rRNA，16 S rRNA，前体 45 S rRNA）及 **Globin mRNA**（包括 HBA1/2, HBB, HBD, HBG1/2, HBM, HBE1, HBQ1, HBZ）的去除，保留其它 mRNA 和非编码 RNA，可显著提高有效数据比例用于后续分析。本试剂盒适用于完整的和部分降解的人血液 total RNA 样品，可与 MGIEasy Fast RNA 文库制备试剂盒搭配使用，用于 RNA 定量、转录组或非编码 RNA 等相关领域的研究。

1.2 适用范围

本试剂盒适用于人血液 total RNA 样本。

1.3 组分

本试剂盒有 2 个规格，分别是 16 RXN 及 96 RXN。货号、组分信息见下表。

试剂盒装中包含信息卡片，客户可通过卡片信息登录 MGI 官网，下载相应说明书及 SDS 文件。

表 1 MGIEasy rRNA & Globin 去除试剂盒 (16 RXN) (货号: 940-001761-00)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy rRNA & Globin 去除 试剂盒 货号: 940-001761-00 规格: 16 RXN	rRNA Probe Mix	○ 白色	32 μ L/支 \times 1
	Hybridization Buffer	○ 白色	80 μ L/支 \times 1
	RNase H Buffer	● 橙色	48 μ L/支 \times 1
	RNase H	● 橙色	32 μ L/支 \times 1









试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
	DNase I Buffer	 蓝色	280 μL/支 × 1
	DNase I	 蓝色	40 μL/支 × 1
	Human Globin Probe Mix	 紫色	8 μL/支 × 1

表 2 MGIEasy rRNA & Globin 去除试剂盒 (96 RXN) (货号: 940-001760-00)

试剂盒及货号	组分信息	管盖颜色	规格及数量
MGIEasy rRNA & Globin 去除 试剂盒 货号: 940-001760-00 规格: 96 RXN	rRNA Probe Mix	 白色	192 μL/支 × 1
	Hybridization Buffer	 白色	480 μL/支 × 1
	RNase H Buffer	 橙色	288 μL/支 × 1
	RNase H	 橙色	192 μL/支 × 1
	DNase I Buffer	 蓝色	840 μL/支 × 2
	DNase I	 蓝色	240 μL/支 × 1
	Human Globin Probe Mix	 紫色	48 μL/支 × 1

1.4 储存与运输

MGIEasy rRNA & Globin 去除试剂盒

- 储存温度: -25 °C~ -15 °C
- 运输温度: -80 °C~ -15 °C
- 有效期: 见试剂盒标签



- 提示
- 若使用干冰进行运输, 请在收到货物后检查是否有剩余的干冰。
 - 当运输条件、储存条件及使用方式都正确时, 所有组分在有效期内均能保持完整活性。

1.5 自备物料清单

实验开始前, 需自备的物料清单如下列表格所示。其中, “可选” 物料是根据具体的实验操作而定, 若 RNA 样本需要进行 DNA 污染的消化, 且消化后需要定量, 则需要自备“Qubit 3.0 荧光定量仪”及对应试剂和试管; 若去除 rRNA 及 Globin mRNA 之后的 RNA 样本需要进行条带分布检测, 则需要自备“Agilent 2100 Bioanalyzer”及对应试剂。

表 3 MGI 产品订购信息

货号	规格	名称
940-000890-00	16 RXN	MGIEasy Fast RNA 建库试剂套装
940-000889-00	96 RXN	MGIEasy Fast RNA 建库试剂套装
940-000961-00	192 RXN	MGIEasy Fast RNA 建库试剂套装

表 4 设备清单

名称	推荐品牌
漩涡混匀仪	/
小型离心机	/
移液器	/
PCR仪	Bio-Rad, 或可梯度降温功能仪器
96 孔板磁力架	ALPAQUA, Part#A00400
1.5mL 管磁力架	Thermo Fisher, Cat. No. 12321D
Qubit 3.0 荧光定量仪 (可选)	Thermo Fisher, Cat. No. Q33216 或同等功能仪器
Agilent 2100 Bioanalyze (可选)	Agilent Technologies, Cat. No. G2939AA 或同等功能仪器

表 5 试剂耗材清单



名称	推荐品牌
Nuclease free water (NF water)	Ambion, Cat. No. AM9937或 Transgen, Cat. No. GI101-03
RNase Zap	Ambion, Cat. No. AM9780
Agencourt RNA Clean XP 40 mL Kit	Agencourt, Cat. No. A63987 或同功能 RNA 纯化磁珠
无水乙醇 (分析纯)	/
DNase I (可选)	NEB, Cat. No. M0303S
Qubit RNA HS Assay Kit (可选)	Invitrogen, Cat. No. Q32852
Agilent RNA 6000 Pico Kit (可选)	Agilent, Cat. No. 5067-1513
无 RNA 酶的移液器吸头	/
1.5 mL无核酸酶不粘管	Ambion, Cat. No. AM12450
0.2 mL PCR 管	Axygen, Cat. No. PCR-02-C 或无核酸酶同款耗材
96 孔板	Axygen, Cat. No. PCR-96M2-HS-C 或无核酸酶同款耗材
Qubit Assay Tubes 或 0.5 mL 透明薄壁管 (可选)	Invitrogen, Cat. No. Q32856 或 Axxygen, Cat. No. PCR-05-C

1.6 注意事项

- 本产品仅用于科研用途，不用于临床诊断，使用前请仔细阅读本说明书。
- 实验前请熟悉需使用的各种仪器的注意事项并掌握其操作方法。
- 本说明书提供的实验流程是通用的，实际可根据具体的实验设计、样本特征、测序应用和设备进行实验流程、反应参数的调整，以优化性能和效率。
- RNA 操作前需戴好口罩手套，用 RNase Zap 杂交液喷洒并擦拭移液器、试管架及桌面。
- 使用 RNase-Free 的吸头，为避免样本交叉污染，推荐使用带滤芯的吸头，吸取不同样本时请更换吸头。
- 本实验过程中会涉及到梯度降温的步骤，需使用带梯度降温功能的 PCR 仪。推荐在带热盖的 PCR 仪中进行各步骤反应，使用前应预热 PCR 仪至反应温度附近。如果 PCR 仪无法设置热盖温度，也可保持在 105 °C。
- 不同功能区使用其专用的移液器等设备；并定时对各实验区域进行清洁（使用 0.5% 次氯酸钠或 10% 漂白剂进行擦拭清理），以保证实验环境的洁净度。
- 应避免皮肤和眼睛直接接触样本及试剂，切勿吞咽样本及试剂，一旦发生意外请立即用大量清水冲洗并及时就医。
- 所有样本和各种废弃物均应按相关法规规定处理。
- 若有其他疑问，请联系 MGI 技术支持：MGI-service@mgi-tech.com

1.7 流程

序号	流程	总时长	手工操作时长
3.1	探针杂交	30 min	5 ~ 8 min
3.2	RNase H 消化	35 ~ 40 min	5 min
3.3	DNase I 消化	35 ~ 40 min	5 min
3.4	RNA 的纯化 	30 ~ 40 min	20 ~ 30 min
3.5	产物质检 	15 ~ 60 min	10 ~ 20 min

-  提示
- 总时长：指 8 个反应理论时长，单次建库样本数增多，时间将延长。
 - 手工操作时长：指该流程累计手工操作的总时长。
 - ：停止点。

2 样本要求及处理

2.1 样本类型及投入量

本试剂盒适用于人血液的 total RNA 样本进行核糖体 RNA 及 Globin mRNA 的去除。

- 对于 RIN 值 (RNA Integrity Number) ≥ 7 的样本, 推荐的 input RNA 量为 10 ng - 1 μ g 的 total RNA, 样本总投入体积 $\leq 18 \mu$ L。
- 对于低质量的 RNA 样本 (RIN < 7), 建议投入量不低于 200 ng。

2.2 Total RNA 样本质量要求

- 用 Agilent 2100 Bioanalyzer 对提取的 total RNA 样本进行质控, 要求 RIN值 ≥ 7 。若 RIN < 7 , 总投入量建议不超过 1 μ g。在后续二代测序文库构建时, 可适当增加投入量并提高 PCR cycles。若 RIN 为 N/A, 则不建议使用此类样本进行文库构建。
- RNA 纯度: $OD_{260/280} = 1.8 \sim 2.0$, $OD_{260/230} \geq 2$ 。 $OD_{260/230} < 2$ 时会显著影响 rRNA 和 Globin mRNA 去除效果。若 $OD_{260/230} < 2$, 建议使用 RNA 纯化磁珠先对 total RNA 样本进行纯化后再进行后续实验, 具体操作可参考第 10 页“RNA 的纯化”。
- 需保证 RNA 样本无基因组 DNA 污染, 否则会影响 rRNA 的去除效果。若有污染 (可用琼脂糖凝胶电泳检测), 需先用 DNase I 进行消化, 具体操作参见第 12 页“关于 RNA 样本的 DNase I 消化”。
- 若样本量不足, 可尝试使用较低的投入量, 可能会导致后续二代测序文库构建时的 PCR 产量较低、分析结果中比对率较低等结果。

3 文库构建标准流程

3.1 探针杂交

本标准实验流程 input RNA 来源：200 ng total RNA（人血液 total RNA），RIN值 ≥ 7 。

 提示 以下操作步骤中，样品切忌涡旋混匀，用吸头混匀即可。

3.1.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 6 试剂准备

试剂名称	要求
NF water	自备物料，室温
rRNA Probe Mix	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存
Human Globin Probe Mix	
Hybridization Buffer	

3.1.2 探针杂交

1. 根据 total RNA 浓度，取适量样本（推荐 200 ng）至新的 0.2 mL PCR 管中，用 **NF water** 补足至总体积 18 μL 。
2. 取一个新的 PCR 管，根据反应数及下表加入探针，并涡旋以充分混匀探针混合液。建议多配制一个反应。

 提示 rRNA Probe Mix 与 Human Globin Probe Mix 应先配制成探针混合液再加入样本中，单独添加可能会导致加入量不准而影响去除效果。

表 7 探针混合液配制 (1个反应需求)

组分	体积
rRNA Probe Mix	1.5 μ L
Human Globin Probe Mix	0.5 μ L
Total	2 μ L

3. 分别吸取混匀的探针混合液 (步骤 2) 和 Hybridization Buffer 至各样本管中。

 提示 探针混合液 和 Hybridization Buffer 需要分开加到 RNA 样品中，避免将二者配成混合液之后使用。

表 8 杂交反应体系

组分	体积
Total RNA + NF water	18 μ L
Hybridization Buffer	5 μ L
探针混合液 (步骤 2)	2 μ L
Total	25 μ L

4. 移液器吹打 15-20 次混匀，瞬时离心使液体收集至管底。将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。


 注意 移液器吹打后，请确保枪头无残留；请确定吹打次数足够，以保证杂交反应体系混合均匀，否则可能会影响最终去除效率。

表 9 杂交反应条件 (体系: 25 μ L)

温度	时间
105 $^{\circ}$ C 热盖	On
95 $^{\circ}$ C	2 min
95 $^{\circ}$ C ~ 22 $^{\circ}$ C	0.1 $^{\circ}$ C/s
22 $^{\circ}$ C	5 min

5. 约 20 min 可以完成反应。反应结束后，立即将 PCR 管置于冰上静置 2 min，瞬时离心使反应液收集至管底。

3.2 RNase H 消化

 提示 以下操作步骤中，样品切忌涡旋混匀，用吸头混匀即可。

3.2.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 10 试剂准备

试剂名称	要求
RNase H	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
RNase H Buffer	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存


3.2.2 RNase H 消化

1. 根据所需反应数，在冰上配制 RNase H 消化反应液，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

表 11 RNase H 消化反应液

组分	单个反应体积
RNase H	2 μ L
RNase H Buffer	3 μ L
Total	5 μ L

2. 吸取 5 μ L RNase H 消化反应液至各样本管中 (3.1.2 节步骤 5)。移液器吹打 15-20 次混匀，瞬时离心后置于冰上。

 注意 移液器吹打后，请确保枪头无残留；请确定吹打次数足够，以保证 RNase H 消化体系混合均匀，否则可能会影响最终去除效率。

3. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 12 RNase H 消化反应条件 (体系: 30 μ L)

温度	时间
45 $^{\circ}$ C 热盖	On
37 $^{\circ}$ C	30 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心使反应液收集至管底。

3.3 DNase I 消化

 提示 以下操作步骤中，样品切忌涡旋混匀，用吸头混匀即可。

3.3.1 准备

试剂：试剂用前混匀，使用后请尽快放回冰箱储存。

表 13 试剂准备

试剂名称	要求
DNase I	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
DNase I Buffer	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存


3.3.2 DNase I 消化

1. 根据所需反应数，在冰上配制 DNase I 消化反应液，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

表 14 DNase I 消化反应液

组分	单个反应体积
DNase I	2.5 μ L
DNase I Buffer	17.5 μ L
Total	20 μ L

2. 吸取 20 μ L DNase I 消化反应液至各样本管 (3.2.2 节步骤 4)。移液器吹打 15-20 次混匀，瞬时离心后置于冰上。

 注意 移液器吹打后，请确保枪头无残留；请确定吹打次数足够，以保证 DNase I 消化体系混合均匀，否则可能会影响最终去除效率。

 提示 混匀过程中如出现气泡，为正常现象，可以瞬时离心后轻弹去除气泡。


3. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 15 DNase I 消化反应条件 (体系: 50 μ L)

温度	时间
45 $^{\circ}$ C 热盖	On
37 $^{\circ}$ C	30 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

4. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心使反应液收集至管底。

3.4 RNA 的纯化

-  提示
- 添加试剂、吸弃上清过程中请勿触碰、吸取磁珠。若不慎吸到磁珠，可将磁珠与液体全部打回管内，再次分离后再吸取上清。
 - 以下操作步骤中，样品切忌涡旋混匀，用吸头混匀即可。

3.4.1 准备

试剂：自备 Agencourt RNA Clean XP 40 mL Kit

表 16 试剂准备

试剂名称	要求
80%乙醇	自备物料， NF water 新鲜配制
NF water	室温暂存
RNA Clean Beads	提前 30 min 取出平衡至室温，每次使用前充分涡旋混匀


3.4.2 RNA 的纯化

 提示 RNA纯化应采用**无 RNA 酶** 1.5 mL 不粘管。

- 涡旋混匀 RNA Clean Beads，吸取 75 μ L RNA Clean Beads 至1.5 mL 不粘管样本管中。
- 将所有样本（3.3.2 节步骤 4）分别转移至已分装好的 RNA Clean Beads 中，用移液器**轻轻吹打**至少 15-20 次至所有磁珠悬浮，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入管中。
- 室温孵育 5 min。
- 将样本管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取上清并丢弃。
- 保持样本管固定于磁力架上，加入 200 μ L 80% 乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s，小心吸取上清并丢弃。
- 重复步骤 5 一次。尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将样本管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程移液器将管底液体吸干。
- 保持样本管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。

 提示 磁珠过度干燥（开裂）将导致产量降低。

- 将样本管从磁力架上取下，加入适量 NF water 进行 DNA 洗脱，用移液器**轻轻吹打**至少 10 次至所有磁珠悬浮。

 提示 从磁珠上洗脱 RNA 样品时，需根据后续操作要求取适量体积的 NF water 进行洗脱。例如，后续使用“MGIEasy Fast RNA文库制备试剂套装”进行二代测序文库构建，则加入 12 μ L NF water 洗脱，洗脱后吸取 10 μ L 上清进行后续的 RNA 片段化反应。

- 室温孵育 5 min。

10. 将样本管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取上清液至新的无核酸酶 0.2 mL PCR 管。

II 停止点 产物纯化后可置冰上继续进行二代测序文库构建或其他分析反应。也可置于 -20 °C 冰箱储存不超过 16 h；-80 °C 冰箱储存不超过 1 周。建议立即进行后续反应。

3.5 产物质检

提示 此步质检为可选操作，若去除后的 RNA 产物直接用于二代测序的文库构建，建议免去此步中间质检环节。

去除核糖体RNA 及 Globin mRNA 的样本经纯化后，用如下方法进行质检检测：

- 取 1 μ L 纯化后的样本，采用 Agilent RNA 6000 Pico 芯片（需自备，见第 2 页“自备物料清单”，具体操作步骤见该产品的操作说明），用 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行检测。如图 1 A，在未去除核糖体 RNA 的 total RNA 样本 2100 图中，有明显的 18 S 和 28 S 峰；如图 1 B，在去除核糖体 RNA 后的 RNA 样本 2100 图中，18 S 和 28 S 峰消失，去除效果较好。

提示 Agilent RNA Nano 芯片达不到检测的灵敏度要求。

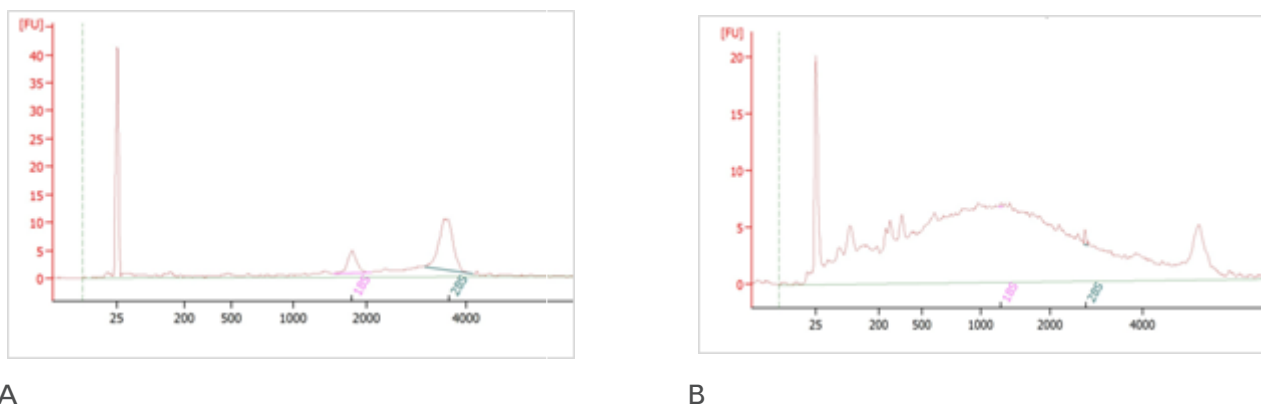


图 1 RNA 样本使用 Agilent RNA 6000 Pico 芯片检测结果

A. 人血液 total RNA 的检测结果

B. 经“MGIEasy rRNA & Globin 去除试剂盒”去除核糖体RNA及Globin之后的人血液样本检测结果

4 附录


4.1 关于 RNA 样本的 DNase I 消化

若 RNA 样本中有基因组 DNA 污染，可先用 DNase I（需自备，见第 2 页“自备物料清单”）对样本进行消化。

因 DNase I 消化的操作会造成一定的 RNA 样本损失，建议该步骤 total RNA 投入量要比预期投入量（本试剂盒所需的 RNA 投入量）适当增加 20%~30%。

例如，若需要投入 200 ng total RNA 样本进行核糖体 RNA 的去除，那么在此步的 DNase I 消化时，需要投入 250 ~286 ng total RNA 样本进行消化，具体消化步骤如下。

受污染 RNA 样本消化

 提示 以下操作步骤中，样品切忌涡旋混匀，用吸头混匀即可。

4.1.1 准备

表 17 试剂准备

试剂名称	要求
NF water	自备物料，常温
DNase I	轻弹底部混匀，离心，冰上暂存
DNase I Buffer	室温解冻，涡旋混匀、离心，冰上暂存

4.1.2 操作

1. 取适量的 RNA 样本至新的无核酸酶 0.2 mL PCR 管中，用 **NF water** 补足至总体积 42.5 μ L。
2. 用 NF water 将 DNase I Buffer 稀释 10 倍（满足每反应 5 μ L）。
3. 根据所需反应数，在冰上配制 DNase I 消化反应液，涡旋混匀，瞬时离心后置于冰上。

表 18 消化反应体系

组分	体积
DNase I	2.5 μ L
10 \times DNase I Buffer	5 μ L
Total	7.5 μ L


4. 吸取 7.5 μ L 消化反应液至各样本管中（步骤 1）。移液器吹打 10 次混匀，瞬时离心后置于冰上。
5. 将 PCR 管置于 PCR 仪上，按下表的条件进行反应。

表 19 消化反应条件（体系：50 μ L）

温度	时间
45 $^{\circ}$ C 热盖	On
37 $^{\circ}$ C	20 min
4 $^{\circ}$ C	Hold

6. 反应结束后，将 PCR 管瞬时离心使液体收集至管底。

4.1.3 样本纯化

-  提示
- 添加试剂、吸弃上清过程中请勿触碰、吸取磁珠。若不慎吸到磁珠，可将磁珠与液体全部打回管内，再次分离后再吸取上清。
 - 以下操作步骤中，样品切忌涡旋混匀，用吸头混匀即可。

4.1.4 准备

试剂：自备 Agencourt RNAClean XP 40 mL Kit


表 20 试剂准备

试剂名称	要求
80%乙醇	自备物料，NF water 新鲜配制
NF water	室温暂存
RNA Clean Beads	提前 30 min 取出平衡至室温，每次使用前充分涡旋混匀


4.1.5 操作

 提示 若使用 1.5 mL 不粘管及适配磁力架进行纯化，请先分别将各样本反应液转移至新的 **无 RNA 酶** 1.5 mL 不粘管。

1. 混匀 RNA Clean Beads，吸取 90 μL RNA Clean Beads 至样本管中（4.1.1.2 节步骤 6），用**移液器轻轻吹打**至少 10 次至所有磁珠悬浮，最后一次应确保将吸头中所有液体及磁珠都打入管中。
2. 室温孵育 5 min。
3. 将样本管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取上清并丢弃。
4. 保持样本管固定于磁力架上，加入 200 μL 80% 乙醇漂洗磁珠及管壁，静置 30 s，小心吸取上清并丢弃。
5. 重复步骤 4 一次。尽量吸干管内液体，有少量残留在管壁时可将样本管瞬时离心，在磁力架上分离后，用小量程移液器将管底液体吸干。
6. 保持样本管固定于磁力架上，打开管盖，室温干燥，直至磁珠表面无反光、无开裂。

 提示 磁珠过度干燥（开裂）将导致产量降低。

7. 将样本管从磁力架上取下，加入适量 **NF water** 进行 DNA 洗脱，用**移液器轻轻吹打**至少 10 次至所有磁珠悬浮。

 提示

- 若纯化后的样本需定量，洗脱时加入 21 μL NF water，洗脱后转移 19 μL 上清液到新的无核酸酶的 PCR 管中，取 1 μL 产物用“Qubit RNA HS Assay Kit”（见“客户自备物料清单”）进行定量。
- 若纯化后的产物不定量，洗脱时加入 20 μL NF water，洗脱后转移 18 μL 上清液到新的无核酸酶的 PCR 管中进行后续的“探针杂交”反应。

8. 室温孵育 5 min。
9. 将样本管瞬时离心，再置于磁力架上静置 2~5 min 至液体澄清，小心吸取上清液至新的无核酸酶 0.2 mL PCR 管。进入下一步反应 第 6 页“探针杂交”。