

# m5C MeRIP试剂盒

## C5-Methylcytidine Methylated RNA Immunoprecipitation (m5C MeRIP) Kit

注:本产品干冰运输;试剂按说明书分别保存于4°C及-20°C,保质期12个月。

### 货号规格/Catalog Number and Size

序号	试剂	货号及规格			储存
		IEP002 (6T)	IEP002M (12T)	IEP002L (24T)	
01	RNase-free water	0.6 mL	1.2 mL	2.4 mL	4°C
02	IP buffer 1	2.75 mL	5.5 mL	11 mL	4°C
03	IP buffer 2	0.125 mL	0.25 mL	0.5 mL	4°C
04	Protein A/G Magnetic Beads	0.125 mL	0.25 mL	0.5 mL	4°C
05	IP buffer 3	17.5 mL	35 mL	70 mL	4°C
06	Elution buffer	2.25 mL	4.5 mL	9 mL	4°C
07	Linear acrylamide	25 mL	50 mL	100 uL	4°C
08	Sodium acetate	0.45 mL	0.9 mL	1.8 mL	4°C
09	Fragmentation buffer	1.5 mL	3 mL	6 mL	4°C
10	EDTA	0.18 mL	0.36 mL	0.72 mL	4°C
11	BSA	0.125 mL	0.25 mL	0.5 mL	-20°C
12	RNase inhibitor	12.5 μL	25 μL	50 μL	-20°C
13	Protease K	12.5 μL	25 μL	50 μL	-20°C

14	IgG Antibody (1mg/mL)	15 $\mu$ L	30 $\mu$ L	60 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C
----	-----------------------	------------	------------	------------	------------------

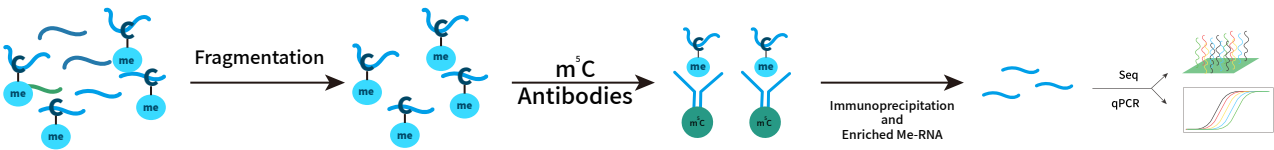
## 产品简介/Product Description

MeRIP (Methylated RNA Immunoprecipitation) RNA 甲基化指发生在 RNA 分子上不同位置的甲基化修饰现象, 常见的 RNA 转录后修饰方式有 6- 甲基腺嘌呤 (N6-methyladenosine, m6A)、5- 甲基胞嘧啶 (C5-methylcytidine, m5C) 和 7- 甲基鸟嘌呤 (N7-methylguanosine, m7G) 等。RNA 甲基化在调控基因表达、剪接、RNA 编辑、RNA 稳定性、控制 mRNA 寿命和降解、介导环状 RNA 翻译等方面可能扮演重要角色。利用甲基化 RNA 免疫共沉淀 (Methylated RNA Immunoprecipitation, MeRIP) 技术, 可以对 RNA 转录后甲基化修饰图谱进行全面研究。

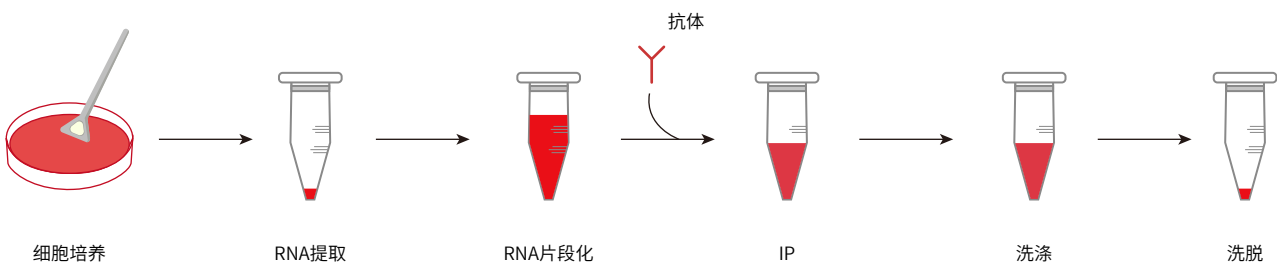
MeRIP 有助于研究 RNA 的化学修饰及其分子机制, RNA 甲基化会在几个层面影响基因的表达: 1) 影响 mRNA 的稳定性; 2) 影响 mRNA 的剪切; 3) 影响 RNA 和蛋白质的结合; 4) 影响 miRNA 的生成等等, 因此 MeRIP 助力解决细胞分化, 生物发育、疾病发生发展、热休克反应等生物学问题。

## 技术路线/Technology mapping

### 1. 原理流程图



### 2. 实验操作流程图



## 使用流程/Procedure

### 1. 细胞 / 组织样品前处理

- ①组织: 大约称取 0.5 g 到研钵里, 立即用液氮研磨;
- ②细胞样本: 收集  $2 \times 10^7$  细胞, 用冰冷的  $1 \times$  PBS 漂洗 1 遍, 1000 r/min 室温离心 5 min, 收集细胞沉淀。  
注意: 适用新鲜的动物组织或超低温保存组织; 枪头、离心管均需无酶, 所使用的试剂均需要用 DEPC 水配制; 自备试剂:  $1 \times$  PBS。

### 2. RNA 提取

- ①向细胞或研磨后的组织加入 2 mL Trizol 裂解，室温放置 3~5 min；
- ②4°C、12,000g 离心 10 min，转移上清至新的无 RNase 管中（细胞样本可省略此步骤）；
- ③按 1 mL Trizol 加入 200  $\mu$ L 氯仿比例添加氯仿至裂解液中，用手剧烈震荡 15 s，室温放置 3 min；
- ④4°C、13,000g 离心 10 min；
- ⑤小心转移上清（约 1 mL，每 500  $\mu$ L 为 1 管）至新的 1.5 mL 无 RNase 管中；
- ⑥加入等倍体积异丙醇，-20°C 或 -80°C 低温沉淀 2 h；
- ⑦ 4°C、13,000g 离心 10 min，保留沉淀，倒弃上清；
- ⑧加入 1 mL 75% 乙醇，涡旋或颠倒混匀，4°C、13000g 离心 5min；
- ⑨倒弃上清，重复离心并吸弃残留的液体，空气干燥 10~15 min；
- ⑩加入 100  $\mu$ L RNase-free water，室温溶解两管 RNA，合并至 1 管。

### 3. RNA 质量检测

- ①配制 1% 琼脂糖凝胶；
- ②取 5  $\mu$ L RNA 样本，120V 电泳 10min，凝胶拍照检测 RNA 质量；
- ③剩余样品，直接进行下游实验或 -80°C 冰箱里保存待用。

**注意：标准情况下，RNA 电泳后 3 条带，条带亮度分别为 2:1:1。**

### 4. RNA 片段化

#### (1) 超声片段化法

- ①RNA 样品中加入 850  $\mu$ L IP buffer 1、4  $\mu$ L RNase inhibitor，非接触式全自动超声波破碎仪，高功率，（30 s + 30 s）超声 15~30 cycles；或接触式超声仪 35% 功率，（2 s + 5 s）超声破碎片段化 10~20 min；
- ②配制 1% 琼脂糖凝胶检测 RNA 片段大小；
- ③取 50  $\mu$ L RNA 样品作为 Input 组，-80°C 保存备用；
- ④剩余 RNA 样品按 400  $\mu$ L/ 管分为 2 管，分别标记为 IP 组、IgG 组。

#### (2) 试剂片段化法

- ①将 RNA 样品碎片化为约 100 nt 长的片段，即在样品中加入 440  $\mu$ L Fragmentation buffer，94°C 处理 5 min；
- ②加入 60  $\mu$ L EDTA，涡旋或颠倒混匀，停止碎裂反应；
- ③加入 4  $\mu$ L Linear acrylamide、60  $\mu$ L Sodium acetate；
- ④-20°C 或 -80°C 静置 2 h 沉淀 RNA 样品；
- ⑤4°C、13,000g 离心 30 min，弃上清；
- ⑥加入 1 mL 预冷的 75% 乙醇，4°C、13,000g 离心 10 min，弃上清，室温静置风干 10 min；
- ⑦加入 850  $\mu$ L IP buffer 1、4  $\mu$ L RNase inhibitor；
- ⑧配制 1% 琼脂糖凝胶检测 RNA 片段大小；
- ⑨取 50  $\mu$ L RNA 样品作为 Input 组，-80°C 保存备用；
- ⑩剩余 RNA 样品按 400  $\mu$ L/ 管分为 2 管，分别标记为 IP 组、IgG 组。

**注意：**

1. 建议 RNA 用量约 50~100  $\mu$ g；
2. MeRIP-Seq 要求处理后的片段大小在 100 nt 左右；
3. MeRIP-qPCR 要求处理后的片段大小在 200~300 nt 左右（超声时间缩短至 8~10 min 或 Fragmentation buffer 94°C 处理缩短至 2 min）。

### 5. 免疫沉淀

- ①IP 组中加入 20  $\mu$ L IP buffer 2、4.2  $\mu$ g ac4C Antibody；IgG 组入 20  $\mu$ L IP buffer 2、4.2  $\mu$ L IgG Antibody，分别置于垂直混匀器 4°C 孵育 4 h。

## 6. 准备 Protein A/G 磁珠

- ①取 40  $\mu\text{L}$  Protein A/G 磁珠，加入 500  $\mu\text{L}$  IP buffer 3，轻轻吹打混匀后置于磁力架上吸附磁珠，去除上清；
- ②加入 360  $\mu\text{L}$  IP buffer 3、40  $\mu\text{L}$  BSA 封闭 Protein A/G 磁珠，4 $^{\circ}\text{C}$ 混合摇动 2 h；
- ③磁力架上吸附磁珠，去除上清；
- ④加入 200  $\mu\text{L}$  IP buffer 3，轻轻吹打混匀后置于磁力架上吸附磁珠，去除上清，共洗涤 2 次；⑤加入 200  $\mu\text{L}$  IP buffer 3，轻轻吹打混匀后按 100 $\mu\text{L}$ /管分为 2 管。

## 7. Protein A/G 与抗体结合

- ①将准备好的 Protein A/G 磁珠分别加入 IP 组和 IgG 组中，垂直混匀器 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h；
- ②磁力架上吸附磁珠，去除上清；
- ③IP 组、IgG 组分别加入 500  $\mu\text{L}$  IP buffer 3，垂直混匀器 4 $^{\circ}\text{C}$ 洗涤 5 min，磁力架上吸附磁珠，去除上清，共洗涤 3 次；
- ④IP 组、IgG 组分别加入 200  $\mu\text{L}$  Elution Buffer、2  $\mu\text{L}$  Protease K，55 $^{\circ}\text{C}$ 消化 30 min，垂直混匀；
- ⑤磁力架上收集磁珠，转移上清至新的无 RNase 管中。

**注意：**如使用水浴锅进行消化，每隔 5 min 轻轻晃动 EP 管，重悬磁珠。

## 8. 提取 RNA

- ①Input 组加入 150  $\mu\text{L}$  Elution Buffer；
- ②向 Input 组、IP 组、IgG 组分别加入等体积（200 $\mu\text{L}$ ）苯酚 - 氯仿 - 异戊醇混合液（25:24:1），颠倒混匀 15 s；
- ③4 $^{\circ}\text{C}$ 、13,000g 离心 10 min，收集上层水相，转移到新的无 RNase 管中；
- ④向 Input 组、IP 组、IgG 组分别加入 1  $\mu\text{L}$  Linear acrylamide、20  $\mu\text{L}$  Sodium acetate 及 400  $\mu\text{L}$  无水乙醇，充分颠倒混匀；
- ⑤-20 $^{\circ}\text{C}$ 或 -80 $^{\circ}\text{C}$ 静置 3 h（或过夜）沉淀 RNA 样品；
- ⑥4 $^{\circ}\text{C}$ 、16,000g 离心 30 min，弃上清；
- ⑦向 Input 组、IP 组、IgG 组分别加入 1 mL 预冷的 75% 乙醇，4 $^{\circ}\text{C}$ 、16,000g 离心 10 min，弃上清，室温静置风干 10 min；
- ⑧分别加入 20  $\mu\text{L}$  RNase-free water，4 $^{\circ}\text{C}$ 、16,000g 离心 10 min，冰上静置保存。

**注意：**

1. 苯酚为水饱和酚；
2. Glycogen 可以使用 linear acrylamide 或 yeast tRNA 替代，同样达到助沉剂效果；
3. RNA -80 $^{\circ}\text{C}$ 、cDNA -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

## 9. RNA 检测与验证

- ①取 1  $\mu\text{L}$  RNA 样品，Agilent 2100 检测 RNA 浓度；
- ②参考逆转录试剂盒说明书对 RNA 样品（IP、IgG 及 Input）进行逆转录；Input、IP、IgG 组应等体积逆转录，以便计算富集效率。一般逆转录 RNA 1  $\mu\text{g}$  左右，参考 Input 组浓度来确定逆转录体积；
- ③参考 PCR 试剂盒说明书配置反应体系进行 PCR，取 3~5  $\mu\text{L}$  PCR 产物 3% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果；
- ④参考 2 $\times$  SYBR Green qPCR Mix 试剂盒说明书配置 20  $\mu\text{L}$  反应体系进行 qPCR，然后进行数据分析，得到富集效率；
- ⑤取 15  $\mu\text{L}$  RNA 样品高通量测序技术检测 RNA 乙酰化位点。

## 注意事项/Notes

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内；
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

