

ac4C acRIP试剂盒

N4-Acetylcytidine Acetylated RNA Immunoprecipitation (ac4C acRIP) 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
		IEP001 (6T)	IEP001M (12T)	IEP001L (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 μ L	30 μ L	60 μ L	-20 $^{\circ}$ C
----	-----------------------	------------	------------	------------	------------------

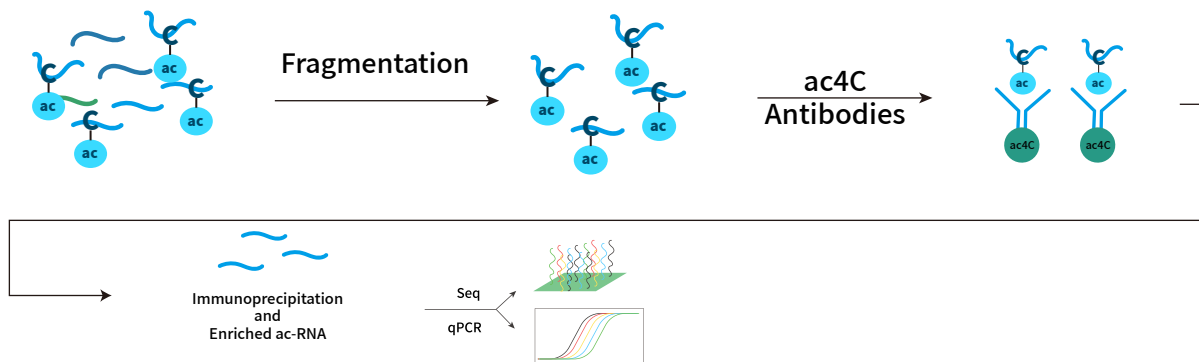
产品简介/Product Description

N4 - 乙酰胞苷 (N4-acetylcytidine, ac4C) 是一种高度保守的 RNA 乙酰化修饰，其广泛存在于真核和原核生物的 tRNA、rRNA 和 mRNA 中，与多种人类疾病、尤其是癌症显著相关。RNA 乙酰化在调控蛋白翻译启动与延伸、增强蛋白翻译准确性、改善 mRNA 稳定性和翻译效率等方面可能扮演重要角色。

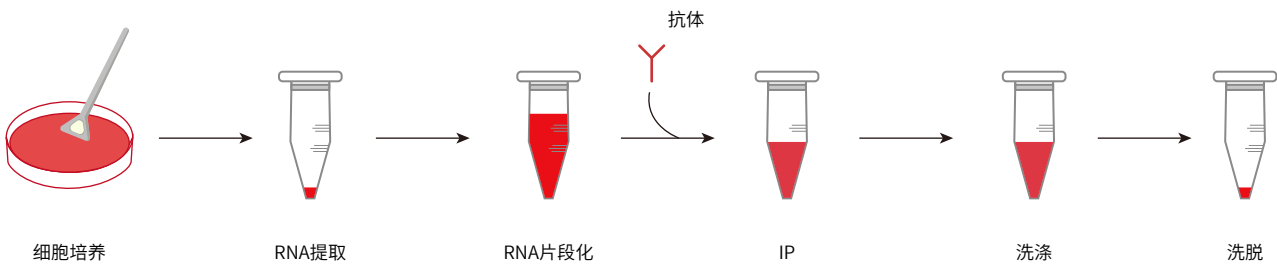
ac4C 修饰不影响互补的 CG 碱基对，在常规 RNA 测序中无法检测到。乙酰化 RNA 免疫沉淀 (acRIP) 通过特异性抗体富集 ac4C RNA，再结合 qPCR (acRIP-PCR) 或高通量测序 (acRIP-seq)，对 RNA ac4C 位点信息进行精确分析。

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 2×10^7 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ L IP buffer 1、4 μ 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 μ L RNA 样品作为 Input 组，-80°C 保存备用；
- ④剩余 RNA 样品按 400 μ 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 μ L Fragmentation buffer，94°C 处理 5 min；
- ②加入 60 μ L EDTA，涡旋或颠倒混匀，停止碎裂反应；
- ③加入 4 μ L Linear acrylamide、60 μ 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 μ L IP buffer 1、4 μ L RNase inhibitor；
- ⑧配制 1% 琼脂糖凝胶检测 RNA 片段大小；
- ⑨取 50 μ L RNA 样品作为 Input 组，-80°C 保存备用；
- ⑩剩余 RNA 样品按 400 μ L/ 管分为 2 管，分别标记为 IP 组、IgG 组。

注意：

1. 建议 RNA 用量 > 100 μ g，最少不低于 50 μ g；
2. acRIP-Seq 要求处理后的片段大小在 100 nt 左右；
3. acRIP-qPCR 要求处理后的片段大小在 200~300 nt 左右（可适当缩短超声时间或 Fragmentation buffer、94°C 处理时间）。

5. 免疫沉淀

- ①IP 组中加入 20 μ L IP buffer 2、4.2 μ g ac4C Antibody；IgG 组入 20 μ L IP buffer 2、4.2 μ 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 μL Protein A/G 磁珠，加入 500 μL 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 μL IP buffer 3、40 μL 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 μL 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 μL IP buffer 3，轻轻吹打混匀后按 100 μL /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 μL 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 μL Elution Buffer、2 μL 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 μL Elution Buffer；
- ②向 Input 组、IP 组、IgG 组分别加入等体积（200 μL ）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 μL Linear acrylamide、20 μL Sodium acetate 及 400 μL 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 μL RNase-free water，4 $^{\circ}\text{C}$ 、16,000g 离心 10 min，冰上静置保存。

注意：苯酚为水饱和酚。

9. RNA 检测与验证

- ①取 1 μL 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 μg 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 μL 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 μL 反应体系进行 qPCR，然后进行数据分析，得到富集效率；
- ⑤取 15 μL 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。

