

GenSeq® m5C MeRIP 试剂盒

GS-ET-003

Instruction Manual Version 1.02

(Updated, March 2022)

试剂盒组分 (10 次反应&)	体积	保存条件
10x Fragmentation Buffer	0.5 mL	4°C
Stop Buffer	0.5 mL	4°C
5 x IP buffer	5 mL	4°C
m5C antibodies	22 μ L	-20°C
IgG antibodies	11 μ L	-20°C
PGM Beads	270 μ L	4°C
Buffer RLT	1.68 mL	4°C
MS Beads	220 μ L	4°C

&: 本试剂盒可用于 10 次 m5C IP 反应，或 5 次 m5C IP + 5 次 IgG IP 反应

自备材料

.....

- ✓ 磁力架(适配 1.5mL 管)
- ✓ 移液器及吸头(无核酸酶)
- ✓ 无核酸酶管 (0.2mL PCR 管及 1.5mL EP 管)
- ✓ PCR 仪
- ✓ 旋转混匀仪或万向摇床
- ✓ 3M 乙酸钠 (PH5.2)
- ✓ 糖原
- ✓ 无水乙醇
- ✓ 无核酸酶水
- ✓ 75% 乙醇 (用无核酸酶水或 DEPC 水新鲜配置)
- ✓ 1 x IP buffer: 用无核酸酶水或 DEPC 水, 将试剂盒自带的 5 x IP buffer 稀释 5 倍数

实验流程

.....

起始样品类型及样品量

建议使用>100 µg 总 RNA，或>3 µg 纯化后的 mRNA*进行 MeRIP 实验。

*: 通过 Oligo(dT)磁珠，或 rRNA-depleted 方法纯化后的 mRNA 样品

注意事项

- (1) 用于实验的起始总 RNA 样品需预先通过 1%琼脂糖凝胶电泳或 Agilent Bioanalyzer 仪进行质检，确认 RNA 样品不存在降解。
- (2) 全部实验过程须使用无核酸酶的试剂和材料，避免 RNase 污染对实验的影响。
- (3) 以下 MeRIP 实验流程以总 RNA 为例。

1. RNA 片段化

- 1) 用无酶水将 RNA 浓度调节至 1 µg/µL。
- 2) 向 200 µL PCR 管中每管加入 18 µL (~18 µg)总 RNA。冰上放置待用。
- 3) 按如下步骤进行 RNA 片段化（每批最多同时操作 5 管）：
 - a. 每管中加 2 µL 10 x Fragmentation Buffer，涡旋混匀并短暂离心；
 - b. 立即将 PCR 管放入预热至 70°C 的 PCR 仪孵育 6 分钟（热盖）；
 - c. 待反应完成取下 PCR 管，立即向每管中加入 2 µL Stop Buffer，涡旋混匀并短暂离心，将管子置于冰上。
- 4) 重复步骤 3)，直到将所有 RNA 片段化。
- 5) 将同一样品的反应液合并，并转移到一个新的 1.5mL EP 管中，用无核酸酶水调整总体积至 270 µL。
- 6) 加入 30 µL 3M 乙酸钠(PH5.2), 1 µL 糖原，750 µL 无水乙醇，轻柔混匀，-20°C或-80°C 沉淀过夜。
- 7) 将沉淀过夜的样品转移至冷冻离心机中，在 4 °C，15,000g 的条件下，离心 25 分钟。
- 8) 用移液器及合适吸头吸弃上清液，不要触碰 RNA 沉淀。
- 9) 加入 1 mL 用无核酸酶水配置的 75% 乙醇。
- 10) 在 4 °C，15,000g 的条件下，离心 15 分钟。
- 11) 用移液器及合适吸头吸弃上清液，不要触碰 RNA 沉淀。
- 12) 打开管盖，将样品管放置在室温条件下干燥 2—5 分钟。
- 13) 加入 50 µL 无核酸酶水使 RNA 沉淀充分溶解，放置于冰上备用。
- 14) 用 Agilent Bioanalyzer 和 Agilent RNA 6000 Pico kit 检测 RNA 片段大小和浓度。或者用

NanoDrop 分光光度计检测片段化的 RNA 浓度，并使用 0.5 µg RNA 进行 1.5% 琼脂糖凝胶检测 RNA 片段大小。（RNA 片段化大小为~200 nt。）

- 15) 取出 3 µg 片段化 RNA 作为 input 组，-80°C 保存备用，该样本将作为 RT-PCR 或 RNA-seq 的 input 对照。剩余的片段化 RNA 均用于后续免疫沉淀实验（步骤 27）。

2. 免疫沉淀磁珠的准备

- 16) 用移液器轻柔吹打 PGM 磁珠使之充分重悬。
- 17) 对每个反应，准备一个新的 1.5mL EP 管，并转移 25 µL PGM 磁珠到管中。
- 18) 用 1 x IP buffer 洗涤 PGM 磁珠：
- 每管中加入 200 µL 1 x IP buffer ，用移液器轻柔混匀；
 - 将离心管放置在磁力架上直到溶液澄清(约 2 分钟)；
 - 吸弃上清液，勿搅动磁珠，从磁力架上取下离心管。
- 19) 重复步骤 18)，再次洗涤。
- 20) 每管中加入 50 µL 1 x IP buffer，用移液器轻柔混匀。
- 21) 每管中加入 2 µL m5C 抗体*。
- *: Mock IP 中，此步加 2 µL 对照 IgG 抗体。*
- 22) 室温下旋转混匀仪或万向摇床旋转孵育 1 小时。
- 23) 短暂离心，将溶液收集至管底。将离心管放置在磁力架上直到溶液澄清(约 2 分钟)。
- 24) 吸弃上清液，勿搅动磁珠。
- 25) 用 1 x IP buffer 洗涤磁珠：
- 从磁力架取下离心管后加入 200 µL 1 x IP buffer ，用移液器轻柔混匀；
 - 将离心管放置在磁力架上直到溶液澄清(约 2 分钟)；
 - 吸弃上清液，勿搅动磁珠。
- 26) 取下离心管盖好管盖冰上放置待用。

3. 免疫沉淀

- 27) 按下表配制 MeRIP 反应液：

试剂	体积
片段化后 RNA（步骤 15）	X µL
Nuclease-free Water	(200-X) µL
5 x IP buffer	50 µL
Total	250 µL

- 28) 将 250 μ L 的混合液加入到步骤 26 准备好的磁珠中。用移液器轻柔吹打数次混匀，使磁珠完全重悬。
- 29) 4 $^{\circ}$ C 旋转混匀仪或万向摇床旋转孵育 1 小时。
- 30) 短暂离心，将溶液收集至管底。将离心管放置在磁力架上直到溶液澄清(约 2 分钟)。
- 31) 吸弃上清液，勿搅动磁珠。
- 32) 用 1 x IP buffer 洗涤磁珠：
 - a. 从磁力架取下离心管后加入 200 μ L 1 x IP buffer ，用移液器轻柔混匀；
 - b. 将离心管放置在磁力架上直到溶液澄清(约 2 分钟)；
 - c. 吸弃上清液，勿搅动磁珠。
- 33) 重复步骤 32，再次洗涤。

4. RNA 纯化

- 34) 用 30 μ L RLT Buffer 重悬磁珠，室温孵育 2 分钟。
- 35) 将离心管放置在磁力架上直到溶液澄清(约 2 分钟)。
- 36) 将上清液转移到新的 1.5mL 离心管，冰上放置备用。
- 37) 用移液器轻柔吹打混匀 MS 磁珠使之充分重悬。对于每个反应，准备一个新的 1.5mL EP 管，并转移 20 μ L MS 磁珠到新管中。
- 38) 将加了 MS 磁珠的 EP 管放置在磁力架上，直到溶液澄清(约 2 分钟)。吸弃上清液，勿搅动 MS 磁珠。
- 39) 用 100 μ L RLT Buffer 完全重悬 MS 磁珠。
- 40) 将离心管放置在磁力架上直到溶液澄清(约 2 分钟)。吸弃上清液，勿搅动 MS 磁珠。
- 41) 用 30 μ L RLT Buffer 重悬 MS 磁珠，加入到步骤 36 的上清液中。
- 42) 加入 60 μ L 无水乙醇，轻柔混匀，室温孵育 1 分钟。
- 43) 将离心管放置在磁力架上直到溶液澄清(约 2 分钟)。
- 44) 吸弃上清液，勿搅动 MS 磁珠。
- 45) 用 75%乙醇清洗 MS 磁珠：
 - a. 从磁力架取下离心管后加入 200 μ L 75%乙醇，用移液器轻柔混匀；
 - b. 将离心管放置在磁力架上直到溶液澄清(约 2 分钟)；
 - c. 吸弃上清液，勿搅动磁珠。
- 46) 重复第 45 步，再次清洗。
- 47) 室温干燥 5 分钟。
- 48) 用 11.25 μ L 无核酸酶水完全重悬，室温孵育 2 分钟。

49) 将离心管放置在磁力架上直到溶液澄清(约 2 分钟)。将 10 μ L 的上清(洗脱的 RNA)转移到新离心管中。RNA 样品立即用于后续实验或 -80°C 保存待用。

.....

FAQs

1. 每个样品都必须做 Mock IP (使用 IgG 抗体) 吗?

Re: 使用 IgG 对照抗体做 Mock IP 的目的, 是为了反映实验体系中的非特异性噪音。一般建议初接触 MeRIP 实验者, 先在个别样品中进行 Mock IP。如已证明实验体系噪音比较小, 无需每个样品都做 Mock IP。

2. MeRIP-qPCR 引物设计有什么需要注意的地方?

Re: 需要注意的地方主要有两点: 1. 逆转录时, 需采用随机引物进行逆转录。2. PCR 产物长度需要控制在 200 bp 以下。