

GenSeq® ac4C RIP 试剂盒

GS-ET-005

Instruction Manual Version 1.03

(Updated, July 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
PC Buffer	0.5 mL	4°C
PC Enhancer	12 µL	-20°C
5 x IP buffer	5 mL	4°C
ac4C antibodies	22 µL	-20°C
IgG antibodies	11 µL	-20°C
PGM Beads	270 µL	4°C
Buffer RLT	1.68 mL	4°C
MS Beads	220 µL	4°C

&: 本试剂盒可用于 10 次 ac4C IP 反应, 或 5 次 ac4C 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
- ✓ 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 RIP 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 IP 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 (例如: 180 µg 总 RNA 可分装为 10 管, 每管 18 µL), 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, 180 µg 总 RNA 可分成 2 批进行片段化):
 - 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), 直到将所有样品管中的 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 PC Buffer, 1 µL PC Enhancer, 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：
 - a. 每管中加入 200 μL 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，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 ac4C 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：
 - a. 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；
 - 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。
- 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 RIP 反应液:

试剂	体积
片段化后 RNA (步骤 15)	X μ L
Nuclease-free Water	(200-X) μ L
5 x IP buffer	50 μ L
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°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 RIP 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. acRIP-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。