

GenSeq® ac4C IP 试剂盒

GS-ET-005

Instruction Manual Version 2.0

(Updated, July 2024)

试剂盒组分 (12 次反应&)	体积	保存条件
10 × Fragmentation Buffer	260 μL	4°C
Stop Buffer	260 μL	4°C
PC Buffer	420 μL	4°C
PC Enhancer	14 μL	-20°C
5 × IP buffer	4.5 mL	4°C
ac4C antibodies	26 μL	-20°C
IgG antibodies	13 μL	-20°C
PGM Beads	320 μL	4°C
Buffer RLT	4.6 mL	4°C
MS Beads	260 μL	4°C
Dig Solution	800 μL	-20°C

&: 此规格试剂盒可用于 12 次 ac4C IP 反应, 或 6 次 ac4C IP + 6 次 IgG IP 反应

试剂盒组分 (24 次反应&)	体积	保存条件
10 × Fragmentation Buffer	500 μL	4°C
Stop Buffer	500 μL	4°C
PC Buffer	830 μL	4°C
PC Enhancer	26 μL	-20°C
5 × IP buffer	9 mL	4°C
ac4C antibodies	52 μL	-20°C
IgG antibodies	26 μL	-20°C
PGM Beads	630 μL	4°C
Buffer RLT	9 mL	4°C
MS Beads	520 μL	4°C
Dig Solution	1.6 mL	-20°C

&: 此规格试剂盒可用于 24 次 ac4C IP 反应, 或 12 次 ac4C IP +12 次 IgG IP 反应

试剂盒组分 (48 次反应&)	体积	保存条件
10 × Fragmentation Buffer	1 mL	4°C
Stop Buffer	1 mL	4°C
PC Buffer	1.7 mL	4°C
PC Enhancer	53 µL	-20°C
5 × IP buffer	18 mL	4°C
ac4C antibodies	104 µL	-20°C
IgG antibodies	53 µL	-20°C
PGM Beads	1260 µL	4°C
Buffer RLT	18 mL	4°C
MS Beads	1040 µL	4°C
Dig Solution	3.2 mL	-20°C

&: 此规格试剂盒可用于 48 次 ac4C IP 反应, 或 24 次 ac4C IP +24 次 IgG IP 反应

自备材料

.....

- ✓ 磁力架(适配 1.5mL 管)
- ✓ 移液枪及吸头(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 × IP buffer: 用无核酸酶水或 DEPC 水, 将试剂盒自带的 5 × IP buffer 稀释 5 倍

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 需预先通过 1%琼脂糖凝胶电泳或 Agilent Bioanalyzer 仪进行质检，确认 RNA 不存在降解。
- (2) 实验全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 acRIP 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, 例如 180 µg 总 RNA 分成 10 管后, 需分成 2 个批次*进行以下片段化操作):
 - a. 每管中加 2 µL 10 × 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 105°C);
 - 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。

**: 第一批次的 5 管 RNA 完成片段化后, 下一批次重复步骤 3), 直到将所有样品完成 RNA 片段化*

- 4) 所有 RNA 完成片段化后, 将同一样品的反应液合并。
- 5) 合并后转移到一个新的 1.5mL EP 管中, 用无酶水调整总体积至 270 µL。
- 6) 依次加入 30 µL PC Buffer, 1 µL PC Enhancer, 750 µL 无水乙醇, 轻柔混匀, -80°C 沉淀 3 小时或过夜。
- 7) 将沉淀过夜的样品转移至低温离心机中, 在 4 °C, 15,000g 的条件下, 离心 25 分钟。
- 8) 用移液枪吸弃上清液, 不要触碰 RNA 沉淀。
- 9) 加入 1 mL 用无酶水配置的 75% 乙醇。
- 10) 在 4 °C, 15,000g 的条件下, 离心 15 分钟。
- 11) 用移液枪吸弃上清液, 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 μ L 无酶水使 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 μ g 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 μ g 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) 用移液枪轻柔吹打 PGM 磁珠使之充分重悬。
- 17) 每个反应准备一个新的 1.5mL EP 管，转移 25 μ L PGM 磁珠到管中。
- 18) 用 1 \times IP buffer 洗涤 PGM 磁珠：
 - a. 每管中加入 200 μ L 1 \times IP buffer ，用移液枪轻柔混匀；
 - 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 μ L 1 \times IP buffer，用移液枪轻柔混匀。
- 21) 每管中加入 2 μ L ac4C 抗体*。
**: Mock IP 中，此步加 2 μ L 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 \times IP buffer 洗涤磁珠：
 - a. 从磁力架取下离心管后加入 200 μ L 1 \times IP buffer ，用移液枪轻柔混匀；
 - 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) 每管中加入 50 μ L 5 \times IP buffer ，用移液枪轻柔混匀。

3. 免疫沉淀

- 27) 将步骤 15)中的 RNA 补无酶水至 200 μL ，加入到步骤 26)的磁珠中，用移液枪轻柔吹打数次混匀，使磁珠完全重悬。
- 28) 4°C 旋转混匀仪或万向摇床旋转孵育 1 小时。
- 29) 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）。
- 30) 吸弃上清液，勿搅动磁珠。
- 31) 用 1 \times IP buffer 洗涤磁珠：
 - a. 从磁力架取下离心管后加入 200 μL 1 \times IP buffer，用移液枪轻柔混匀；
 - 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。
- 32) 重复步骤 31)，再次洗涤。
- 33) 加 55 μL Dig Solution 到磁珠中，用移液枪轻柔吹打几次，使磁珠重悬浮。
- 34) 55°C，旋转混匀 45 分钟。

4. RNA 纯化

- 35) 准备 MS 磁珠：
 - a. 用移液枪轻柔吹打混匀 MS 磁珠，按 AcRIP 反应数准备新的 1.5 mL EPP 管，分别取 20 μL 磁珠到各个管中，管子上标记好样品；
 - b. 置于磁力架上待液体澄清（约 2 分钟），用移液枪吸弃上清，勿扰动磁珠；
 - c. 将管子从磁力架上取下，每管加入 200 μL RLT Buffer，用移液枪轻柔吹打混匀；
 - d. 置于磁力架上待液体澄清（约 2 分钟），用移液枪吸弃上清，勿扰动磁珠；
 - e. 将管子从磁力架上取下，每管加入 150 μL RLT Buffer，重悬 MS 磁珠。
- 36) 将步骤 34)中的样品置于磁力架 2 分钟，用移液枪转移 50 μL 上清到 150 μL MS 磁珠中，移液枪吹打混匀。
- 37) 加入 200 μL 无水乙醇，轻柔混匀，室温孵育 5 分钟。
- 38) 吸弃上清液，勿搅动 MS 磁珠。
- 39) 用 75%乙醇清洗 MS 磁珠：
 - a. 保持样品始终处于磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 75%乙醇漂洗磁珠（注意不要吹散磁珠），室温孵育 30 秒，小心移除上清；
 - b. 重复上述步骤（a）一次
- 40) 室温干燥 2-5 分钟。
- 41) 加入 11.25 μL 无酶水完全重悬磁珠，室温孵育 2 分钟。
- 42) 将离心管放置在磁力架上直到溶液澄清（约 2 分钟），将 10 μL 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。