



# 操作手册

Genelily™ m<sup>7</sup>GMeRIP试剂盒

— GK-4044

试剂盒组分(十次反应&)	体积	保存条件
10x Fragmentation Buffer	0.5 ml	4°C
Stop Bufer	0.5 ml	4°C
5x IP buffer	5 ml	4°C
m7G antibodies	22 µl	-20°C
IgG antibodies	11 µl	-20°C
PMG Beads	270 µl	4°C
Proteinasa K	1.1 ml	-20°C

**&:本试剂盒可用于10次m<sup>7</sup>G IP反应，或m<sup>7</sup>G IP+5次IgG IP反应**

## 自备材料

1. 磁力架 (适配1.5 ml管)
2. 移液器及吸头 (无核酸酶)
3. 无核酸酶管 (0.2 ml PCR管及1.5ml EP管)
4. PCR 仪
5. 旋转混匀仪或万向摇床
6. 3M 乙酸钠 (PH5.2)
7. 糖原
8. 无水乙醇
9. 无核酸酶水
10. 75% 乙醇 (用无核酸酶水新鲜配置)
11. 1x IP buffer: 用无核酸酶水或DEPC水, 将试剂盒自带的5x IP buffer稀释5倍数
12. RNA clean&concentrantor™-5试剂盒 (Zymo Research)

## 实验流程

### 起始样品类型及样品量

建议使用 $>100\mu\text{g}$  总RNA, 或 $>3\mu\text{g}$  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  $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。
- 2 向  $200\ \mu\text{l}$  PCR 管中每管加入  $18\ \mu\text{l}$  ( $\sim 18\ \mu\text{g}$ ) 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  $2\ \mu\text{l}$   $10\times$  Fragmentation Buffer, 涡旋混匀并短暂离心;
  - b. 立即将 PCR 管放入预热至  $70^\circ\text{C}$  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  $2\ \mu\text{l}$  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  $\mu$ l。
- 6 加入 30  $\mu$ l 3M 乙酸钠(PH5.2), 1  $\mu$ l 糖原, 750  $\mu$ l 无水乙醇, 轻柔混匀, -20 或-80 沉淀过夜。
- 7 将沉淀过夜的样品转移至冷冻离心机中, 在 4  $^{\circ}$ 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  $^{\circ}$ 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  $\mu$ l 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  $\mu$ gRNA 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 $\mu$ g片段化RNA作为input组, -80 $^{\circ}$  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 1.5 ml EP 管，并转移 25  $\mu$ l PGM 磁珠到管中。

用 1 x IP buffer 洗涤 PGM 磁珠：

- 18
- 每管中加入 200  $\mu$ l 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  $\mu$ l 1 x IP buffer，用移液器轻柔混匀。

21 每管中加入 2  $\mu$ l m<sup>7</sup>G 抗体\*。

\*: Mock IP 中，此步加 2  $\mu$ 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。

用 1 x IP buffer 洗涤磁珠：

- 25
- 从磁力架取下离心管后加入 200  $\mu$ l 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

按下表配制 MeRIP 反应液：

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

将 250  $\mu$ 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。

4°C 旋转混匀仪或万向摇床旋转孵育 1 小时。

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)。

吸弃上清液，勿搅动磁珠。

用 1 x IP buffer 洗涤磁珠：

- 从磁力架取下离心管后加入 200  $\mu$ l 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。

重复步骤 32，再次洗涤。

加 50  $\mu$ l Proteinase K 反应液到磁珠中，用移液器轻柔吹打几次，使磁珠重悬浮；55°C 孵育 30 分钟；

- 35 将离心管置于磁力架上 2 分钟，用移液器转移上清到新的 1.5 ml 离心管中，冰上保存；
- 36 加入 50  $\mu$ l Proteinase K 反应液到磁珠中，用移液器轻柔吹打几次，使磁珠重悬浮；55 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟；
- 37 置于磁力架上 2 分钟，用移液器转移上清与步骤 35 中的上清合并，总体积约 100  $\mu$ l。

## 4. RNA 纯化

### 用 RNA clean&concentrator<sup>TM</sup>-5 试剂盒纯化上步洗脱下的 RNA:

- 38 加 200  $\mu$ l RNA Binding Buffer 到步骤 37 中的 RNA 样品中，用移液枪轻柔吹打几次混匀；
- 39 加入 300 $\mu$ l 的无水乙醇，盖好管盖，上下颠倒几次使样品充分混匀；
- 40 将混合后样品加入到 Zymo-Spin 柱子中，12,000g 离心 30 秒，弃滤液；
- 41 加入 400 $\mu$ l RNA Prep Buffer 到柱子上，12,000g 离心 30 秒，弃滤液；
- 42 加入 700 $\mu$ l RNA Wash Buffer 到柱子上，12,000g 离心 30 秒，弃滤液；
- 43 加入 400 $\mu$ l RNA Wash Buffer 到柱子上，12,000g 离心 30 秒，弃滤液；
- 44 将柱子放回收集管，12,000g 离心 2 分钟，将柱子放到新的收集管上。
- 45 加入 20 $\mu$ l Nuclease-free 水到柱子上，室温孵育 2 min，12,000g 离心 30 秒，保留滤液。
- 46 对洗脱的 RNA 进行 Nandrop 定量，剩余 RNA 进行后续实验或-80 $^{\circ}$ C保存备用。

## 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。