天净沙系列

CAT#: 261112

低温运输，-20℃保存

天净沙

m5C 甲基化 RNA 免疫沉淀试剂盒(含 m5C 抗体)

m5C MeRIP Kit (Contains m5C Antibody)

使用手册 V0.8

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是 m5C 甲基化 RNA 免疫沉淀试剂盒。MeRIP，即 RNA 甲基化指发生在 RNA 分子上不同位置的甲基化修饰现象，常见的 RNA 转录后修饰方式有 6-甲基腺嘌呤、5-甲基胞嘧啶和 7-甲基鸟嘌呤等。RNA 甲基化在调控基因表达、剪接、RNA 编辑、RNA 稳定性、控制 mRNA 寿命和降解、介导环状 RNA 翻译等方面可能扮演重要角色。甲基化 RNA 免疫共沉淀技术，有助于研究 RNA 的化学修饰以及其分子机制，对解决细胞分化、生物发育、疾病发生发展、热休克反应等生物学问题具有重大意义。本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用 logo 热封袋包装

成份	编号	规格	包装
DEPC 水	6-0776	1.08 mL	1.5 mL 本色管
IP 缓冲液 1	261112a	5.4 mL	10 mL 本色瓶
IP 缓冲液 2	261112b	240 μL	1 mL 黄盖管
Protein A/G 磁珠	261029	240 μL	1 mL 蓝盖管
IP 缓冲液 3	261112c	33 mL	60 mL 本色瓶
洗脱缓冲液	261112d	4.2 mL	5 mL 本色瓶
糖原	CAS:9005-79-2	36 μL	1 mL 绿盖管
醋酸钠缓冲液	C127-09-3	840 μL	1.5 mL 本色管
裂解缓冲液	261112e	2.64 mL	5 mL 本色瓶
EDTA	240829	360 μL	1 mL 黄盖管
BSA	CAS:9048-46-8C	240 μL	1 mL 蓝盖管
RNase 抑制剂	251204	24 μL	1 mL 红盖管
蛋白酶 K	28-EC3.4.21.64	24 μL	1 mL 绿盖管
IgG 抗体（1 mg/mL）	261112f	24 μL	1 mL 本色管
M5C 抗体（1 mg/mL）	261112g	24 μL	1 mL 本色管
使用手册	261112sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备物品

1×PBS、Trizol、氯仿、异丙醇、75%乙醇、无水乙醇、苯酚-氯仿-异戊醇混合液（25:24:1）。

使用方法

一、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 细胞后，用冰冷的 1×PBS 漂洗，1000×g 室温离心 5 min，收集细胞沉淀。

二、RNA 提取

3. 向细胞或研磨后的组织加入 2 mL Trizol 裂解，室温放置 3~5 min；

4. 4℃、12000×g 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）；

5. 按 1 mL Trizol 加入 200 μL 氯仿至裂解液中，用手剧烈震荡 15 s，室温放置 3 min；

6. 4℃、13000×g 离心 10 min；

7. 小心转移上清（约 1 mL，每 500 μL 为 1 管）至新的 1.5 mL 无 RNase 管中；

8. 加入等倍体积异丙醇，-20℃或-80℃低温沉淀 2 h；

9. 4℃、13000×g 离心 10 min 后留下沉淀，倒弃上清液；

10. 加入 1 mL 75%乙醇，涡旋或颠倒混匀，4℃、13000×g 离心 5 min；

11. 倒弃上清液，重复离心并吸弃残留的液体，空气干燥 10~15 min；

12. 加入 100 μL DEPC 水溶解两管 RNA，合并至一管。

三、RNA 质量检测

13. 配制 1%琼脂糖凝胶；

14. 取 5 μL RNA 样本 120 V 电泳 10 min，凝胶拍照检测 RNA 质量；

15. 剩余样品，直接进行下游实验或-80℃冰箱里保存待用。

四、RNA 片段化

A、超声片段化法

16. RNA 样品中加入 850 μL IP 缓冲液 1、4 μL RNase 抑制剂，非接触式全自动超声波破碎仪，高功率，（30s+30s）超声 15~30 cycles，或接触式超声仪 35%功率，（2s+5s）超声破碎片段化 10~20 min；

17. 配制 1%琼脂糖凝胶检测 RNA 片段大小；

18. 取 50 μL RNA 样品作为 Input 组，-80℃保存备用；

19. 剩余 RNA 样品按 400 μL/管分为 2 管，标记为 IP 组、IgG 组。

B、试剂片段化法

20. 将 RNA 样品碎片化为约 100 nt 长的片段，即在样品中加入 440 μL 裂解缓冲液，94℃处理 5 min，反应结束后取出样本立即置于冰上；

21. 加入 60 μL EDTA，涡旋或颠倒混匀，停止碎裂反应；

22. 加入 2 μL 糖原、60 μL 醋酸钠缓冲液及 1.2 mL 无水乙醇；

23. -20℃或-80℃静置 2 h 沉淀 RNA 样品；

24. 4℃、13000×g 离心 30 min，弃上清；

25. 加入 1 mL 预冷的 75%乙醇，4℃、13000×g 离心 10 min，弃上清，室温静置风干 10 min；

26. 加入 850 μL IP 缓冲液 1、4 μL RNase 抑制剂溶解 RNA 样品；

27. 配制 1%琼脂糖凝胶检测 RNA 片段大小；

28. 取 50 μL RNA 样品作为 Input 组，-80℃保存备用；

29. 剩余 RNA 样品按 400 μL/管分为 2 管，分别标记为 IP 组、IgG 组。

五、免疫沉淀

30. IP 组中加入 20 μL IP 缓冲液 2、4μg M5C 抗体，IgG 组加入 20 μL IP 缓冲液 2、4μg IgG 抗体，分别置于垂直混匀器 4℃孵育 4h。

六、准备 Protein A/G 磁珠

31. 取 40 μL Protein A/G 磁珠，加入 500 μL IP 缓冲液 3，轻轻吹打混匀后置于磁力架上吸附磁珠，去除上清；

32. 加入 360 μL IP 缓冲液 3、40 μL BSA 封闭 Protein A/G 磁珠，4℃混合摇动 2 h；

33. 磁力架上吸附磁珠，去除上清；

34. 加入 200 μL IP 缓冲液 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；

35. 加入 200 μL IP 缓冲液 3，轻轻吹打混匀后按 100 μL/管分为 2 管。

七、Protein A/G 磁珠与抗体结合

36. 将准备好的 Protein A/G 磁珠分别加入 IP 组和 IgG 组，垂直混匀器 4℃孵育 1h；

37. 磁力架上吸附磁珠，去除上清；

38. IP 组、IgG 组分别加入 500 μL IP 缓冲液 3，垂直混匀器 4℃洗涤 5 min，磁力架上吸附磁珠，去除上清，共洗涤 3 次；

39. IP 组、IgG 组分别加入 200 μL 洗脱缓冲液、2 μL 蛋白酶 K，55℃消化 30 min，垂直混匀；

40. 磁力架上收集磁珠，转移上清至新的无 RNase 管中。

八、提取 RNA

41. Input 组加入 150 μL 洗脱缓冲液；

42. 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 15s；

43. 4℃、13000×g 离心 10 min，收集上层水相，转移到新的无 RNase 管中；

44. 向 Input 组、IP 组、IgG 组分别加入 1 μL 糖原、20 μL 醋酸钠缓冲液及 400 μL 无水乙醇，充分颠倒混匀；

45. －20℃或-80℃静置 3h（或过夜）沉淀 RNA 样品；

46. 4℃、16000×g 离心 30 min，弃上清；

47. 向 Input 组、IP 组、IgG 组分别加入 1 mL 预冷的 75%乙醇，4℃、16000×g 离心 10 min，

	弃上清，室温静置风干 10 min； 48. 分别加入 20 μL DEPC 水，冰上静置保存。 49. RNA 检测与验证，通过 PCR 技术、高通量测序等对 RNA 样品（IP、IgG 及 Input）进行分析。
关联产品	Protein A/G 磁珠，2 μm，10 mg/mL