

Methylated RNA Immunoprecipitation(meRIP) Kit

（适用于组织和细胞）

KT107-01 系列：无 m6A 抗体体系

Cat.No. KT107-0101 （12 rxns）

Cat.No. KT107-0102 （24 rxns）

Cat.No. KT107-0103 （48 rxns）

KT107-02 系列：含 m6A 抗体体系

Cat.No. KT107-0201 （12 rxns）

Cat.No. KT107-0202 （24 rxns）

Cat.No. KT107-0203 （48 rxns）

按试剂标签提示分开储存

For research use only, not intended for diagnostic testing

产品简介:

meRIP (Methylated RNA Immunoprecipitation, 甲基化 RNA 免疫沉淀) 技术是一种用于研究 RNA 甲基化修饰的实验技术。主要是利用特异性抗体 (如抗 m6A 抗体) 识别并结合 RNA 上的甲基化修饰位点, 形成抗体-RNA 复合物, 通过免疫共沉淀的方法, 使用 proteinA/G Agarose 捕获并富集这些修饰的 RNA 片段, 随后, 对富集的 RNA 片段进行高通量测序或 qPCR 验证, 以分析其甲基化状态。

试剂盒包装组分:

表 1 KT107-01 试剂盒包装组分信息

室温保存试剂				
编号	试剂	数量(12 rxns)	数量(24 rxns)	数量(48 rxns)
SCmeR-1	10×Fragmentation buffer	500μL	1mL	2mL
SCmeR-2	0.5M EDTA	500μL	1mL	2mL
SCmeR-3	5×IP buffer	40mL	80mL	160mL
SCmeR-4	Elution buffer	1.5mL	3mL	6mL
SCmeR-5	RNase-free water	15mL	30mL	60mL
4℃保存试剂				
SCmeR-6	proteinA/G Agarose	1.2mL	2.4mL	4.8mL
-20℃保存试剂				
SCmeR-7	DNase buffer	400μL	800μL	1.6mL
SCmeR-8	DNase	75μL	150μL	300μL
SCmeR-9	RNasin	180μL	360μL	720μL
SCmeR-10	RVC	200μL	400μL	800μL
SCmeR-11	阴性抗体 IgG	40μL	80μL	160μL

表 2 KT107-02 含 m6A 试剂盒包装组分信息

室温保存试剂				
编号	试剂	数量(12 rxns)	数量(24 rxns)	数量(48 rxns)
SCmeR-1	10×Fragmentation buffer	500μL	1mL	2mL
SCmeR-2	0.5M EDTA	500μL	1mL	2mL
SCmeR-3	5×IP buffer	40mL	80mL	160mL
SCmeR-4	Elution buffer	1.5mL	3mL	6mL
SCmeR-5	RNase-free water	15mL	30mL	60mL
4℃保存试剂				
SCmeR-6	proteinA/G Agarose	1.2mL	2.4mL	4.2mL
-20℃保存试剂				
SCmeR-7	DNase buffer	400μL	800μL	1.6mL
SCmeR-8	DNase	75μL	150μL	300μL
SCmeR-9	RNasin	180μL	360μL	720μL
SCmeR-10	RVC	200μL	400μL	800μL

SCmeR-11	阴性抗体 IgG	40μL	80μL	160μL
SCmeR-12	m6A 抗体	40μL	80μL	160μL
阳性对照体系：（-20℃保存）				
SCmeR-13	阳性 q-PCR 检测引物 SON mix	25μL(10μM)	50μL(10μM)	100μL(10μM)

注：对照组与实验组消耗试剂量相同，一次 meRIP 实验含 Input 组、目的抗体组、阴性抗体组，要消耗 2 rxns 试剂量。

对照体系说明：

阴性对照组抗体（包含阴性对照抗体 IgG），适用于大多数哺乳动物细胞和组织。

阳性 q-PCR 检测引物 SON(H)：

FOR: 5' -ggactcccagatgttagcgtc-3'

REV: 5' -ggagtccatggagctagtgtgc-3'

实验前准备

细胞准备 (Time: 30min)

A 动物组织处理：

细胞量：约 $2-3 \times 10^8$ 个

动物组织经过组织匀浆或液氮研磨后，去除大颗粒组织后用 PBS 重悬细胞，清洗 2-3 次，3000rpm 离心 3min，去除上清后-80℃保存或继续进行实验。

注：尽量将上清液彻底吸干再保存。

B 动物悬浮细胞处理：

细胞量：约 $2-3 \times 10^8$ 个

悬浮细胞培养好后连同培养液收集到离心管中，3000rpm 离心收集细胞沉淀；细胞沉淀用 PBS 重悬再离心去上清，重复清洗细胞 3 次，去除上清后-80℃保存或继续进行实验。

注：尽量将上清液彻底吸干再保存。

C 贴壁细胞处理：

细胞量：约 $2-3 \times 10^8$ 个

贴壁细胞培养好后，用胰酶消化或者细胞刮刮下转移到离心管中，3000rpm 离心收集细胞沉淀；细胞沉淀用 PBS 重悬再离心去上清，重复清洗细胞 3 次，去除上清后-80℃保存或继续进行实验。

注：尽量将上清液彻底吸干再保存。

需要的额外材料:

试剂:

目的抗体 (m6A) (含 m6A 抗体体系试剂盒不需自备)

PBS 溶液

BSA 粉末或溶液

RNA 提取试剂: Trizol 或酚氯仿异戊醇提取液

3M 醋酸钠 (pH 5.2)

无水乙醇

逆转录试剂

q-PCR 检测试剂

糖原

仪器设备:

旋转仪

低温高速离心机

q-PCR 仪

实验过程摘要：

如图 1 所示，首先进行总 RNA 的提取并将其片段化，然后将片段化 RNA 与抗体孵育，再将 RNA-抗体复合物与 proteinA/G Agarose 孵育，然后经适当条件洗涤使与抗体结合的 RNA 与孵育液中的其他成分分离。最后通过洗脱缓冲液将 RNA 从 proteinA/G Agarose 上洗脱下来，经纯化回收后获得 meRIP 产物 RNA。产物可通过 q-PCR 检测特定的 RNA，或通过测序分析。

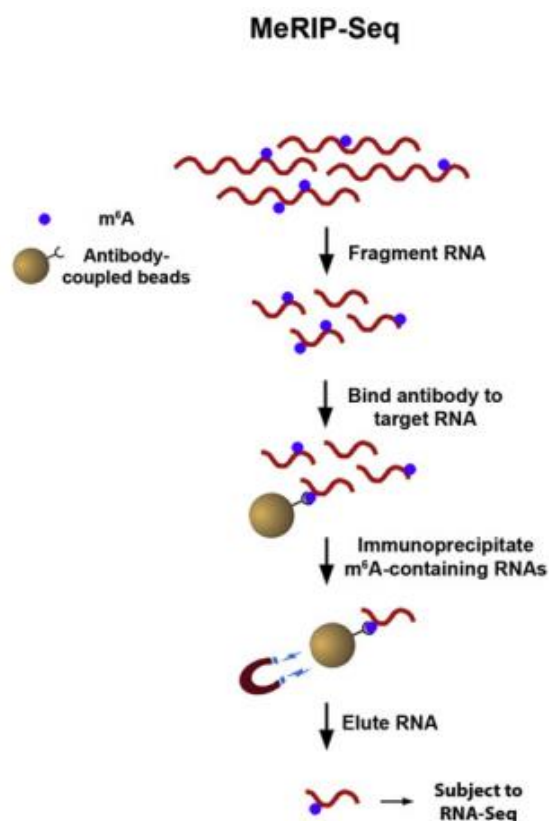


图 1 meRIP 试剂盒实验过程示意图

meRIP 实验步骤

注：实验环境为 Nuclease-free 环境，全过程须使用无 RNase 污染的实验用具和试剂，操作过程中也要防止 RNase 污染。

分组：Input（总 RNA），目的（m6A 抗体），阴性对照（IgG）

1.总 RNA 提取及基因组 DNA 去除：（Time: 过夜）

a. $2-3 \times 10^8$ 个细胞用 Trizol 提取总 RNA，300 μ L RNase-free water（SCmeR-5）溶解 RNA，测 RNA 浓度（RNA 总量 $>300\mu$ g），然后按以下方法处理去除基因组 DNA。

b. 每管加入 30 μ L 10 $\times$ DNase buffer（SCmeR-7），以及 6 μ L DNase（SCmeR-8）混匀，37 $^{\circ}$ C 孵育 30min；

c. Trizol-氯仿-乙醇重新抽提纯化 RNA，取 2 μ L RNA 用 1.5% 的琼脂糖凝胶检测 RNA 的完整性（28S 和 18S 清晰可见）。

2.RNA 片段化处理：（Time: 5min）

a. 将总 RNA 浓度调成 1 μ g/ μ L，然后将其分成 18 μ L 每管；

b. 按下表配制 RNA 片段化处理体系：

Component	Volume(μ L)	Final
RNA	18	18 μ g
10 $\times$ Fragmentation buffer (SCmeR-1)	2	1 $\times$
Total volume	20	

c. 300 μ g 总 RNA 需要 17 管。94 $^{\circ}$ C 处理 3-5min。然后立即加入 2 μ L 0.5M EDTA（SCmeR-2）涡旋混匀，短暂离心后置于冰上，将 17 管 RNA 合并在一起。

注：RNA 片段化 94 $^{\circ}$ C 处理 3-5min，可先取少量 RNA 进行处理时间的梯度检测，可将时间梯度设为 3min，4min，5min，然后进行步骤 3,4，1.5% 琼脂糖凝胶检测 RNA 断裂的情况，片段集中在 100-300nt，选择合适的打断时间。

3.片段化 RNA 的纯化：（Time: 过夜）

a. 向 300 μ L RNA 中加入 30 μ L 3 M 醋酸钠 (pH 5.2) 和 1 μ L 糖原，以及 750 μ L 的无水乙醇，混匀，于 -80 $^{\circ}$ C 沉淀过夜。

b. 12,000rpm，4 $^{\circ}$ C 离心 25min，小心去除上清。用 75% 乙醇洗，12,000rpm，4 $^{\circ}$ C 离心 15min，去上清，室温开盖晾干。

c. 用 300 μ L RNase-free water（SCmeR-5）溶解，放于冰上继续后续实验或 -80 $^{\circ}$ C 保存。

4. RNA 片段检测：

取 2 μ L 片段化的 RNA 用 1.5%琼脂糖凝胶检测 RNA 断裂情况。

注：片段集中在 100-300nt。

5. RNA 与抗体结合：（Time：2h）

a.留 1.5 μ L 片段化 RNA 作为 Input（1%Input）；

b.将剩下的片段化 RNA 均分为两份，m6A 抗体组和 IgG 组，再分别加 RNase-free water（SCmeR-5）稀释至 755 μ L；

c.按下表配制 IP 反应混合物：

组成	体积
片段化 RNA	755 μ L (mRNA>5 μ g, 总 RNA>300 μ g)
RNasin (40U/ μ L) (SCmeR-9)	10 μ L
RVC (200mM) (SCmeR-10)	10 μ L
5 $\times$ IP buffer (SCmeR-3)	200 μ L
m6A 抗体 (SCmeR-12) /IgG 抗体 (SCmeR-11)	5 μ g
Total	1000 μ L

d.用封口膜封口，置于 4 $^{\circ}$ C 旋转孵育 2 h。

6. proteinA/G Agarose 与抗体的孵育：（Time：4h）

a.上下颠倒重悬 proteinA/G Agarose 并平衡至室温。

b.标记实验所需的无 RNase 的 1.5mL EP 管，目的 m6A 组和阴性对照 IgG 组。

c.分别吸取 100 μ L proteinA/G Agarose（SCmeR-6）于标记的 EP 管中，3000rpm 离心 1 min，去上清。

d.每管加入 500 μ L 1 $\times$ IP buffer 重悬清洗 proteinA/G Agarose 2 次，去上清。

e.用 500 μ L 1 $\times$ IP buffer（含 0.5mg/mL BSA）重悬 proteinA/G Agarose，4 $^{\circ}$ C 旋转封闭 2 小时。

f. 500 μ L 1 $\times$ IP buffer 洗两次，去除上清。

g.将上一步的 RNA-抗体混合物与 proteinA/G Agarose 孵育，用封口膜封口，置于 4 $^{\circ}$ C 旋转孵育 2 h。

h.移除上清，1mL 1 $\times$ IP buffer（含 5 μ L-RNasin（SCmeR-9）和 10 μ L-RVC（SCmeR-10））

洗 3 次。

注：1× IP buffer：用 RNase-free H₂O（SCmeR-5）将 5× IP buffer（SCmeR-3）稀释。

7. RNA 提取纯化（Time：过夜）

a. 每组中分别加入 100μL Elution buffer（SCmeR-4）。

b. 向管中加入 500μL 的 Trizol 溶液，涡旋振荡 10s，室温静置 10min；再加入 100μL 氯仿(1/5 Trizol 体积)，涡旋振荡 10s，室温静置 10min。

c. 4℃，12000rpm 离心 10min 后小心吸取上层水相至新的无 RNase 离心管中。

注：在抽提 RNA 过程中，要小心吸取上清，避免吸到下层有机相。

d. 加入 1/10 3M 醋酸钠 (pH 5.2)，2.5 倍体积无水乙醇，1μL 糖原，混匀，-20℃ 沉淀过夜。

e. 4℃，12000rpm 离心 15min 后小心去除上清，开盖晾干 3-5min，用 15μL RNase-free H₂O（SCmeR-5）溶解。得到的溶液为纯化的 RNA，检测 RNA 浓度，-80℃ 保存。

注：乙醇沉淀 RNA 后要小心移除上清，防止 RNA 丢失

q-PCR 检测注意事项：

1. 为了保证单一变量，input 组、m6A 抗体组、IgG 组获得的 RNA 产物最终用相同体积的水溶解，并且在逆转录过程中用相同体积 RNA 进行逆转录，不要测浓度之后把产物浓度调一致。

2. input 组是取 1% 提取的总 RNA 量，q-PCR 的 Ct 值是 1/100 底物的数据，计算时 Ct 要减去 6.64。

3. q-PCR 结果计算示例：

$$\Delta Ct [\text{normalized IP}] = (Ct [\text{IP}] - (Ct [\text{Input}] - \text{Log}_2 (\text{Input Dilution Factor})))$$

$$\% \text{ Input} = 2^{(-\Delta Ct [\text{normalized IP}])} \times 100\%$$

我们的 input 是总量的 1/100，即稀释了 100 倍， $\text{Log}_2 (\text{Input Dilution Factor}) \approx 6.64$

计算示例：

	input	U1C
U1	16.05	15.55

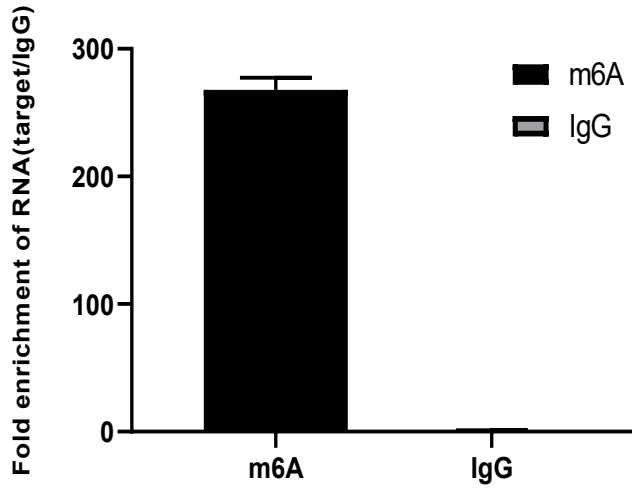
$$\Delta Ct = 15.55 - (16.05 - 6.64) = -6.14 \quad \% \text{ input} = 2^{(-6.14)} \times 100\% = 1.4\%$$

结果展示：

阳性体系q-PCR检测:

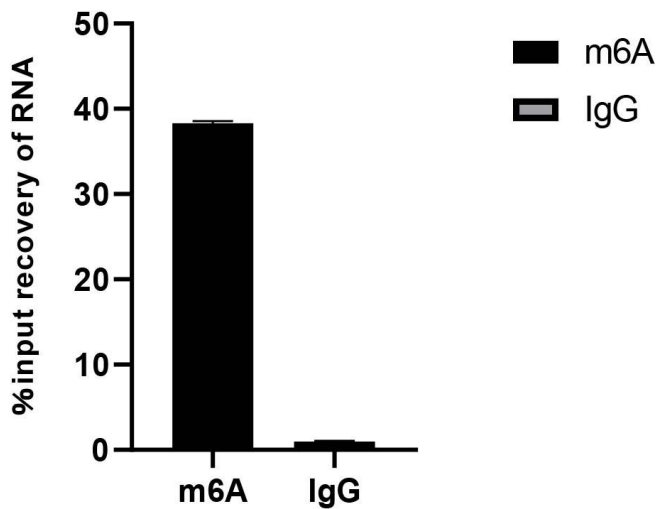
q-PCR 检测 SON mRNA 在 m6A 组和 IgG 组的富集情况。

A



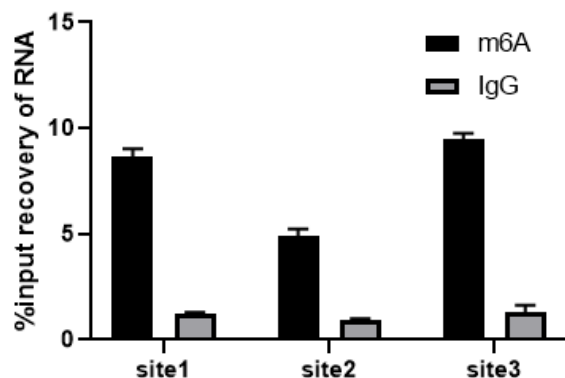
图A Fold Enrichment法(富集倍率)

B



图B Percent Input法(%input)

meRIP-qPCR结果案例:



通过信息学预测得到 3 个可能与 m6A 结合的位点，设计引物通过 qPCR 检测，结果表明 3 个位点均具有 m6A 修饰。

问题解决方案：

问题	解决方案
抗体裂解物中的免疫蛋白质	在 meRIP 实验之前，通过 dotblot 确认抗体可以 IP 免疫沉淀感兴趣的 RBP
	选择针对抗原的不同表位的抗体
	确认抗体同种型与蛋白 A 或 G 的免疫沉淀相容
低 RNA 产量	大多数 RNA 结合蛋白免疫沉淀不能产生可测量的 RNA。而通过 RT-PCR 可以检测亚纳克量的 RNA
	如果在 cDNA 合成后检测不到 RNA，请考虑上面的免疫沉淀故障排除。
RNA 降解	确保无 RNA 酶的工作条件和用具，并且不引入 RNA 酶，在孵育溶液中使用 RNA 酶抑制剂。
没有检测到 RNA	在 -80℃ 下增加乙醇沉淀的孵育时间
	RNA 乙醇沉淀物有时非常小。去除上清液时，一定不要吸走 RNA 沉淀
RT-PCR 无产物	增加不同量的 cDNA 加入到 PCR 反应中

	增加扩增反应的循环次数
	确保在 q-PCR 仪上正确设置扩增反应程序
	重新检查引物的正确 Tm
	RNA 打断时间过长，RNA 片段小于 100bp，PCR 引物无法扩增，调整 RNA 打断时间
m6A 和 IgG IP 的 PCR 产物之间的数量没有差异	确保正确的抗体质量和质量较好的 RNA 用于 IP
	减少加入 PCR 反应的 cDNA 量
	减少分析 cDNA 的循环数。重要的是在 PCR 的线性扩增阶段内分析 PCR 产物，可以测量起始 DNA 的量之间的差异。