Waals™ MeRIP Kit, MRI01-20T

操作说明

- **描　述：**Waals™ MeRIP Kit，包含 Protein A/G Magnetic Beads, RNA IP Buffer, 10 x RNA Fragmentation Buffer, 0.5 M EDTA, Penol:Chloroform:Isopentanol, Proteinase K, 10% SDS, Solution I, Solution II, Solution III, Nuclease-Free Water。
- **试剂盒储存：**Waals™ MeRIP Kit (Part I)，4℃储存（勿冷冻）；Waals™ MeRIP Kit (Part II)，-20℃储存。
- **自备试剂：**Anti-m^{6}A 抗体、Anti-IgG 抗体、无水乙醇
- **介　绍**

细胞中存在大量 m^{6}A 修饰的 RNA，它们发挥着重要的生物学功能。Waals™ MeRIP Kit 提供 Protein A/G 磁珠，可稳定结合 Anti-m^{6}A antibody；通过与 RNA 的 m^{6}A 结合捕获含 m^{6}A 修饰的 RNA；提供 RNA 纯化试剂可将 RNA 有效纯化用于后续研究，如 qRT-PCR、RNA-sequencing 等。

操作步骤

- **RNA 提取**

1. 用 Trizol 法或试剂盒（e.g. Waals™ RNA Extraction Kit）提取细胞或组织中的总 RNA。
2. 采用紫外分光光度计法测定总 RNA 的浓度，采用琼脂糖凝胶电泳评估总 RNA 的完整性。

- **RNA 片段化**

1. 将 50~100 μg 总 RNA 稀释至 1μg/μL。
2. 取 18 μL 总 RNA 至 PCR 管中，加入 2 μL 10 x RNA Fragmentation Buffer，混匀。每个样本分为 5 管进行平行实验。
3. 将 PCR 管置于 PCR 仪器中，运行程序 94°C, 3-5 分钟。立即将 PCR 管置于冰上，加入 2μL 0.5 M EDTA，混匀。
4. 将每个样本（5 管平行实验）中的溶液转移至一个新的 1.5 mL 无酶离心管中，混匀，吸取 2μL 作为 Input。剩余用无菌无酶水将溶液体积补足至 200 μL。

■ **免疫沉淀**

1. 用 Waals™ MeRIP Kit 提供的试剂按照下表配制 **MeRIP Mix**：

试剂名称	体积
RNA IP Buffer	300μL
片段化 RNA	200μL
抗体（Anti-m^{6}A 或 Anti-IgG）	4μg
	500 μL

2. 置于 4℃旋转孵育 4 小时。

■ **磁珠准备**

1. 重悬 Protein A/G 磁珠，吸取 50 μL 至无酶离心管中。
2. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
3. 将离心管从磁力架上取出，加入 100 μL RNA IP Buffer，重悬磁珠。
4. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
5. 重复步骤 3 和 4。
6. 将离心管从磁力架上取出，加入 500 μL RNA IP Buffer（4℃预冷），重悬磁珠。

■ **MeRIP**

1. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
2. 将离心管从磁力架上取出，分别加入 500μL **MeRIP Mix**，温和重悬。
3. 4℃**旋转**反应 2 小时。
4. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
5. 将离心管从磁力架上取出，加入 500 μL RNA IP Buffer (4℃预冷)，温和重悬。
6. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
7. 重复步骤 5 和 6，3 次。
8. 将离心管从磁力架上取出，加入 500 μL RNA IP Buffer (4℃预冷)，温和重悬。
9. 用 Waals™ MeRIP Kit 提供的试剂按照下表配制 **Proteinase Mix**：

试剂名称	体积 (μL)
RNA IP Buffer	130
Proteinase K	5
10% SDS	15
	150 μL

10. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
11. 将离心管从磁力架上取出，加入 150 μL **Proteinase Mix**，温和重悬。
12. 55℃**旋转**（或每 5 分钟重悬磁珠 1 次）反应 20 分钟。
13. 将离心管置于磁力架上，收集上清液于新的无酶离心管中，并加入 250 μL RNA IP Buffer 至每管。

■ **RNA Isolation**

1. 加入 400 μL Penol:Chloroform:Isopentanol 至每管。
2. 涡旋 15 秒，室温 14,000 rmp 离心 10 分钟。
3. 取 350 μL 上清液至新的无菌无酶离心管，并加入 400 μL 氯仿。
4. 涡旋 15 秒，室温 14000 rmp 离心 10 分钟。
5. 取 300 μL 上清液至新的无菌无酶离心管。
6. 分别在每管中加入 50 μL Solution I，15 μL Solution II，5 μL Solution III，以及 850 μL 预冷的无水乙醇。
7. 颠倒混匀，置于-20℃或-80℃至少 1 小时或过夜，以沉淀 RNA。
8. 将离心管 14,000 rpm，4℃离心 30 分钟，弃掉上清液。
9. 加入 80%无水乙醇，14,000 rpm，4℃离心 15 分钟，弃掉上清液，空气干燥。
10. 用 15 - 25μL Nuclease-Free Water 溶解 RNA 沉淀，置于冰上，或-80℃保存。