

GenSeq® ac4C IP 试剂盒

GS-ET-005

Instruction Manual Version 2.3

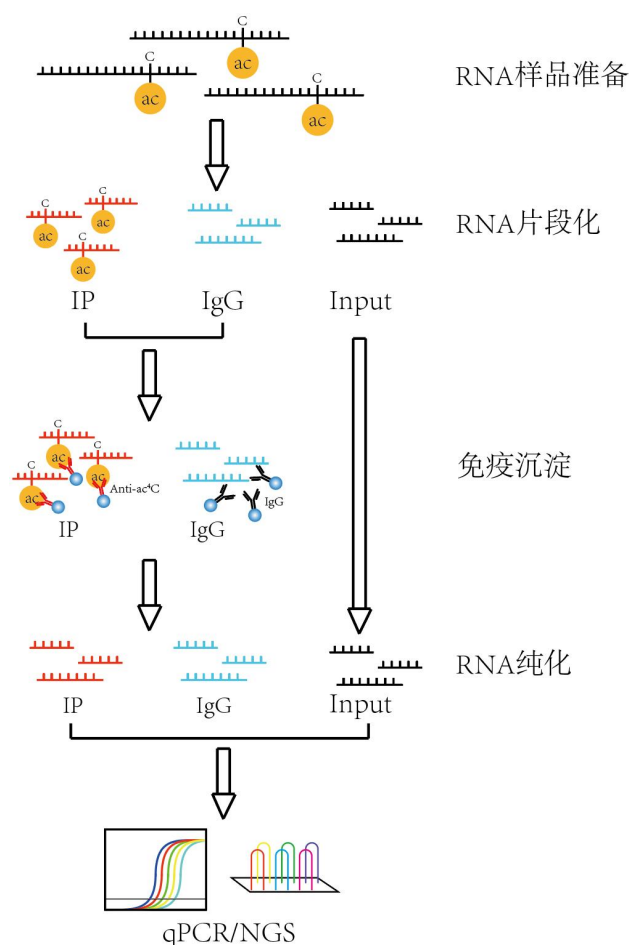
(Updated, Mar 2025)

产品简介

RNA 修饰是目前生命科学中热门的前沿领域之一。早期研究发现 ac4C 修饰存在于真核生物中丝氨酸及亮氨酸 tRNA 和 18S rRNA 上，导致 Watson-Crick 碱基热稳定性增加，调控蛋白合成中的编码准确性；近期研究发现 ac4C 分布在人类转录组中，大多数位点出现在编码序列（CDS）内，并且通过改善 mRNA 稳定性和翻译促进靶基因表达。

GenSeq® ac4C IP 试剂盒专为 RNA ac4C 研究而设计，通过 acRIP 方法，可以实现对转录组中 ac4C 修饰区域的特异性富集。本试剂盒包含了 ac4c 免疫沉淀实验流程中的所有核心试剂，具有更好的性价比。新研发的 RNA 纯化步骤在保证 IP 后 RNA 产量的同时减少了实验时间。此外，试剂盒中包含了对照 IgG 抗体，便于用户进行实验质控，保证了实验的严谨性。优化过的实验流程极其简洁和高效，富集得到的 ac4C RNA 可以广泛应用于后续的定量 RT-PCR、高通量测序以及其它检测分析。

实验流程图



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	4°C
PGM Beads	320 µL	4°C
5 × IP Buffer	4.5 mL	4°C
ac4C antibodies	13 µL	-20°C
IgG antibodies	13 µL	-20°C
Dig Solution	800 µL	-20°C
MS Beads	260 µL	4°C
Buffer RLT	4.6 mL	4°C

*: 此规格试剂盒可用于 6 次 ac4C 反应 + 6 次 IgG 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	4°C
PGM Beads	630 µL	4°C
5 × IP Buffer	9 mL	4°C
ac4C antibodies	26 µL	-20°C
IgG antibodies	26 µL	-20°C
Dig Solution	1.6 mL	-20°C
MS Beads	520 µL	4°C
Buffer RLT	9 mL	4°C

*: 此规格试剂盒可用于 12 次 ac4C 反应 + 12 次 IgG 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	4°C
PGM Beads	1260 µL	4°C
5 × IP Buffer	18 mL	4°C
ac4C antibodies	53 µL	-20°C
IgG antibodies	53 µL	-20°C
Dig Solution	3.2 mL	-20°C
MS Beads	1040 µL	4°C
Buffer RLT	18 mL	4°C

*: 此规格试剂盒可用于 24 次 ac4C 反应 + 24 次 IgG 反应

自备材料

=====

- ✓ 磁力架（适配 1.5 mL EP 管）
- ✓ 移液枪及枪头（无核酸酶）
- ✓ 无核酸酶管（0.2 mL PCR 管及 1.5 mL 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（用无核酸酶水新鲜配置）
- ✓ 1 × IP Buffer: 用无核酸酶水，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 acRIP 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。
- (3) Dig Solution 融化过程中产生絮状物，属于正常情况。
- (4) 在 RNA 纯化过程中产生絮状物，属于正常情况。
- (5) 以下实验流程以总 RNA 为例。

1. RNA 片段化

- 1) 用无核酸酶水将 RNA 浓度调整至 1 µg/µL。
- 2) 向 200 µL PCR 管中加入 18 µL (~18 µg) 总 RNA*，冰上放置备用。

*: 180 µg 总 RNA 可分装为 10 管，每管 18 µg；36 µg 总 RNA 可分装为 2 管，每管 18 µg。
- 3) 按如下步骤进行 RNA 片段化*：
 - 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 5 min**（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 PCR 管置于冰上。

*: 每批最多同时操作 5 管，例如 180µg 总 RNA 分成 10 管后，需分成 2 个批次进行片段化操作，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。

**：该条件可以将 RNA 片段化至~200nt，若研究者实验所需片段与此不同，需研究者根据实验类型进行预实验确定合适的片段化条件。

***：Stop Buffer 需快速加入，防止片段化时间不一致导致 RNA 片段大小不同。
- 4) 若一个样品分装多管进行片段化，将片段化后的分装的同一个样品合并后转移到一个新的 1.5mL EP 管中，用无核酸酶水调整总体积至 270 µL。
- 5) 依次加入 30 µL PC Buffer, 1 µL PC Enhancer, 750 µL 预冷的无水乙醇，涡旋混匀，-20 °C 或-80 °C沉淀 3 h 或过夜。
- 6) 将沉淀产物 4 °C，15,000g 离心 25 min。
- 7) 用移液枪吸弃上清，务必注意不要触碰到 RNA 沉淀。
- 8) 加入 1 mL 用无核酸酶水配置的 75% 乙醇，4 °C，15,000g 离心 15 min。
- 9) 用移液枪吸弃上清，务必注意不要触碰到 RNA 沉淀。

- 10) 室温开盖干燥 2-5 min。
- 11) 加入 50 μ L 无核酸酶水充分溶解 RNA 沉淀，放置于冰上备用。
- 12) 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后的 RNA 浓度，并使用 0.5 μ g RNA 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 片段大小*。
- *: 若片段化后 RNA 进行琼脂糖凝胶检测，琼脂糖凝胶上样孔有条带，说明起始样本有污染。
- 13) 取出 1-3 μ g 片段化后的 RNA 作为 input 组，-80°C 保存备用，该样本将作为 input 对照。剩余的片段化后的 RNA 用于后续免疫沉淀实验（步骤 27）。

2. 免疫沉淀磁珠的准备

- 14) 用移液枪轻柔吹打 PGM Beads 使之充分重悬。
- 15) 按 acRIP 反应数准备新的 1.5mL EP 管，分别取 25 μ L PGM Beads 到 EP 管中。
- 16) 将 EP 管放置在磁力架上待溶液澄清（约 2 min）。
- 17) 吸弃上清，勿搅动磁珠，从磁力架上取下 EP 管。
- 18) 用 1 $\times$ IP Buffer 洗涤 PGM Beads:
 - a. 每管中加入 200 μ L 1 $\times$ IP Buffer，用移液枪轻柔吹打混匀；
 - b. 将 EP 管放置在磁力架上待溶液澄清（约 2 min）；
 - c. 吸弃上清，勿搅动磁珠，从磁力架上取下 EP 管。
- 19) 重复步骤 18)，再次洗涤。
- 20) 每管中加入 50 μ L 1 $\times$ IP Buffer，用移液枪轻柔吹打混匀。
- 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 h。
- 23) 短暂离心，将溶液收集至管底，将 EP 管放置在磁力架上待溶液澄清（约 2 min）。
- 24) 吸弃上清，勿搅动磁珠。
- 25) 用 1 $\times$ IP Buffer 洗涤 PGM Beads:
 - a. 从磁力架取下 EP 管后加入 200 μ L 1 $\times$ IP Buffer，用移液枪轻柔吹打混匀；
 - b. 将 EP 管放置在磁力架上待溶液澄清（约 2 min）；
 - c. 吸弃上清，勿搅动磁珠。
- 26) 每管中加入 50 μ L 5 $\times$ IP Buffer，用移液枪轻柔吹打混匀。

3. 免疫沉淀

- 27) 将步骤 13) 中的 RNA 补无核酸酶水至 200 μ L，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 h*。

*孵育时间若过度延长，会增加免疫沉淀后产物的非特异性，影响实验结果准确性。

- 29) 短暂离心，将溶液收集至管底，将 EP 管放置在磁力架上待溶液澄清（约 2 min）。
- 30) 吸弃上清，勿搅动磁珠。
- 31) 用 1 × IP Buffer 洗涤 PGM Beads:
- a. 从磁力架取下 EP 管后加入 200 μL 1 × IP Buffer，用移液枪轻柔吹打混匀；
 - b. 将 EP 管放置在磁力架上待溶液澄清（约 2 min）；
 - c. 吸弃上清，勿搅动磁珠。
- 32) 重复步骤 31)，再次洗涤。
- 33) 每管加入 55 μL Dig Solution，移液枪轻柔吹打数次混匀，使磁珠完全重悬。
- 34) 55°C 旋转混匀仪或万向摇床旋转孵育 45 min*。

*:实验过程中 55°C 旋转混匀仪或万向摇床旋转孵育 45 min 此步骤没有对应的仪器可以替代的方法有三种：1.使用恒混混匀仪。2.放置在 55°C 烘箱中，每隔 5min 移液枪吹打混匀。3.放置在 55°C 水浴锅，每隔 5min 移液枪吹打混匀，使用此方法需要注意不要污染。在此步骤中磁珠未均匀分散在 EP 管中，对 IP 后 RNA 产率有一定影响。

4. RNA 纯化

- 35) 准备 MS Beads:
- a. 用移液枪轻柔吹打混匀 MS 磁珠，按反应数准备新的 1.5 mL EP 管，分别取 20 μL MS Beads 到 EP 管中；
 - b. 将 EP 管放置在磁力架上待溶液澄清（约 2 min），吸弃上清，勿扰动磁珠；
 - c. 将 EP 管从磁力架上取下，每管加入 200 μL Buffer RLT，移液枪轻柔吹打混匀；
 - d. 将 EP 管放置在磁力架上待溶液澄清（约 2 min），吸弃上清，勿扰动磁珠；
 - e. 将 EP 管从磁力架上取下，每管加入 150 μL Buffer RLT，重悬 MS Beads。
- 36) 将步骤 34) 中的样品置于磁力架 2 min，用移液枪转移 50 μL 上清到 150 μL MS Beads 中，移液枪吹打混匀。
- 37) 加入 200 μL 无水乙醇，移液枪轻柔吹打混匀，室温孵育 5 min。
- 38) 将 EP 管放置在磁力架上待液体澄清（约 2 min），移液枪吸弃上清，勿扰动磁珠。
- 39) 用无核酸酶水配置的 75%乙醇漂洗 MS Beads:
- a. 保持样品始终处于磁力架上，加入 500 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 s，小心移除上清；
 - b. 重复上述步骤（a）一次
- 40) 室温干燥 2-5 min。
- 41) 加入 11.25 μL 无核酸酶水重悬磁珠，室温孵育 2 min。
- 42) 将 EP 管放置在磁力架上待溶液澄清（约 2 min），将 10 μL 的上清（洗脱的 RNA）转移到新的 EP 管中，RNA 样品立即用于后续实验或 -80°C 保存待用。

FAQ

=====

1. 本试剂盒适用于所有物种吗？

Re: 本试剂盒适用于所有物种。

2. 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。如已证明实验体系噪音比较小，无需每个样品都做 Mock IP。

3. 在本试剂盒中，总 RNA 和纯化后的 mRNA 都是可供选择的起始样本，然而究竟哪一种效果更为理想呢？

Re: 纯化后的 mRNA 作为起始样本能够减少其他非编码 RNA 的干扰，让研究者更精准地聚焦于 mRNA 上的修饰信息，从而提高实验的针对性和结果的准确性；总 RNA 作为细胞内全部 RNA 的集合体，能为研究者提供一个相对宏观的视角，可以全面探索不同类型 RNA 的修饰情况。总之，只对 mRNA 上的修饰感兴趣，可以用纯化后 mRNA 作为 MeRIP 实验起始样品；样品量少或还对除 mRNA 外的其它 RNA 上的修饰感兴趣，可以用总 RNA 作为 MeRIP 实验起始样品。

4. 必须使用>100 µg 总 RNA 或>3 µg 纯化后的 mRNA 进行实验吗？

Re: 较多的起始 RNA 量可以增加检测到低丰度修饰转录本的概率，如果已知目标 RNA 有较高的 RNA 修饰水平，可以适当降低起始量，推荐起始量不低于 36 µg 总 RNA 或 1 µg 纯化后的 mRNA。

5. 降低起始量，本试剂盒的流程以及用量需要改变吗？

Re: 降低起始量，本试剂盒的流程以及用量不需要改变。需要注意的是 10× Fragmentation Buffer 的反应终浓度为 1×，例如起始量为 1 µg mRNA，需补水至 18 µL 的倍数后根据实验流程进行实验。

6. 使用本试剂盒后续进行 qPCR 实验有什么需要注意的地方？

Re: 需要注意的地方主要有三点：

- 1) 片段化时间应适当减少，推荐片段化时间改为 70°C，3min。具体片段化条件需自行摸索（qPCR 实验中推荐的片段化 RNA 分布范围为 300-500 nt）。
- 2) 逆转录时，需采用随机引物进行逆转录。
- 3) 设计引物时，PCR 产物长度需要根据片段化时间自行控制，推荐控制在 200 bp 左右。序列获取以及设计引物不属于购买此试剂盒的服务范围，请谅解。

7. 使用本试剂盒后续进行高通量测序实验有什么需要注意的地方？

Re: 由于 acRIP 实验过程中已经对 RNA 进行了片段化，因此用本试剂盒产物进行建库时，无须再进行 RNA 片段化。

相关产品:

试剂盒	货号	规格
GenSeq® m6A MeRIP Kit	GS-ET-001	12T、24T、48T
GenSeq® m1A MeRIP Kit	GS-ET-002	12T、24T、48T
GenSeq® m5C MeRIP Kit	GS-ET-003	12T、24T、48T
GenSeq® m7G MeRIP Kit	GS-ET-004	12T、24T、48T
GenSeq® ac4C IP Kit	GS-ET-005	12T、24T、48T
GenSeq® RIP Kit	GS-ET-006	12T、24T、48T
GenSeq® O8G IP Kit	GS-ET-007	12T、24T、48T
GenSeq® Ψ IP Kit	GS-ET-008	12T、24T、48T
GenSeq Hi-C Kit	GS-EG-003	6T
GenSeq® Co-Immunoprecipitation (CoIP) Kit	GS-EG-008	12T、24T
GenSeq® CHIRP Kit	GS-EG-009	12T、24T
GenSeq® RNA Pull Down Kit	GS-EG-010	12T、24T
GenSeq® RCA DNA Amplification Kit	GS-MB-002	25T、100T

上海云序生物科技有限公司

服务电话：021-64878766

网址：<http://www.cloud-seq.com.cn>

地址：上海市松江区漕河泾莘砖公路 518 号 24 号楼 4 楼

