

# GenSeq® m1A MeRIP 试剂盒

**GS-ET-002**

Instruction Manual Version 2.3

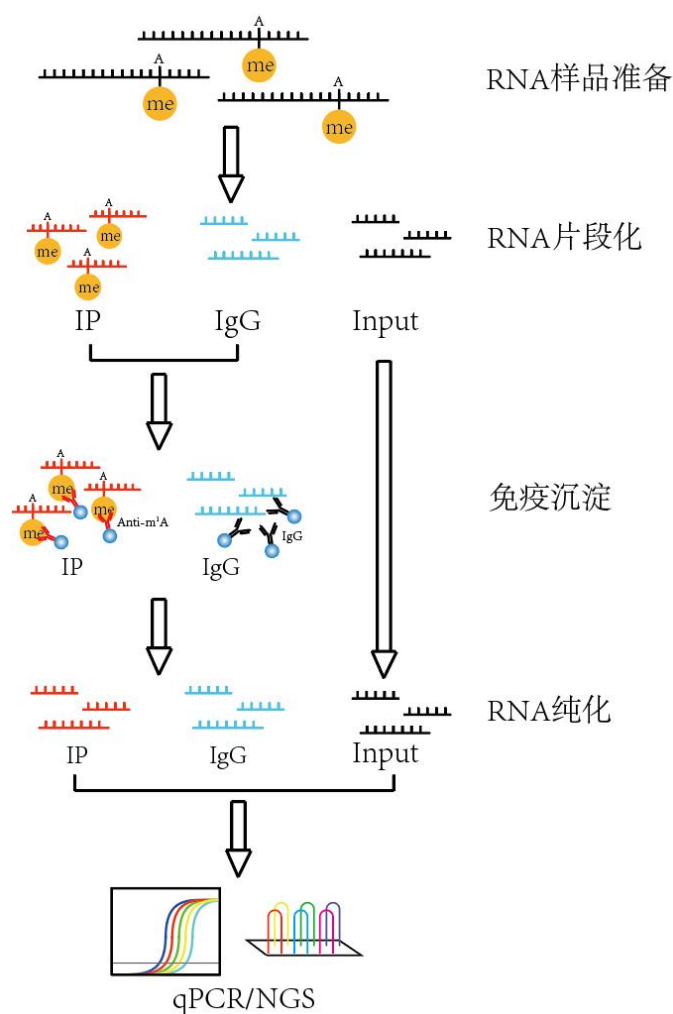
(Updated, Mar 2025)

## 产品简介

RNA 修饰是目前生命科学中热门的前沿领域之一。m1A 修饰广泛存在于 mRNA、tRNA、rRNA 和其它非编码 RNA 上,并在酵母、植物和哺乳动物等真核物种中都有发现。近期 Nature 等重磅期刊表明: m1A 修饰在 mRNA 的翻译调控中发挥着重要的作用。

GenSeq® m1A MeRIP 试剂盒专为 RNA m1A 研究而设计,通过 MeRIP 方法,可以实现对转录组中 m1A 修饰区域的特异性富集。本试剂盒采用高盐/低盐缓冲液连续洗脱的流程,可以大幅降低背景噪音,提升信噪比,此外,新研发的 RNA 纯化步骤在保证 IP 后 RNA 产量的同时减少实验时间。本试剂盒包含了 MeRIP 流程中的所有核心试剂,具有更好的性价比。试剂盒中还包含了对照 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 m1A 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   |
| m1A antibodies           | 13 µL  | -20°C |
| IgG antibodies           | 13 µL  | -20°C |
| LB Buffer                | 6 mL   | 4°C   |
| HS Buffer                | 6 mL   | 4°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 m1A 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   |
| m1A antibodies           | 26 µL  | -20°C |
| IgG antibodies           | 26 µL  | -20°C |
| LB Buffer                | 12 mL  | 4°C   |
| HS Buffer                | 12 mL  | 4°C   |
| Dig Solution             | 1.6mL  | -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 m1A 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   |
| m1A antibodies           | 53 µL   | -20°C |
| IgG antibodies           | 53 µL   | -20°C |
| LB Buffer                | 24 mL   | 4°C   |
| HS Buffer                | 24 mL   | 4°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 m1A 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
- ✓ 无核酸水
- ✓ 75% 乙醇（用无核酸水新鲜配置）
- ✓ 1 × IP Buffer: 用无核酸水将试剂盒自带的 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 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 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，可将片段化后的分装的同一个样品合并后转移到一个新的 1.5 mL EP 管中，用无核酸水调整总体积至 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  $\mu$ L 无核酸水充分溶解 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  $\mu$ 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  $\mu$ g 片段化后的 RNA 作为 input 组，-80°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 MeRIP 反应数准备新的 1.5 mL EP 管，分别取 25  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L 1  $\times$  IP Buffer，用移液枪轻柔吹打混匀。
- 21) 每管中加入 2  $\mu$ L m1A 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 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 补水至 200  $\mu$ 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) 用 LB Buffer 洗涤 PGM Bead:

- a. 从磁力架取下 EP 管后加入 200 μL LB 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。

34) 重复步骤 33)，再次洗涤。

35) 用 HS Buffer 洗涤 PGM Bead:

- a. 从磁力架取下 EP 管后加入 200 μL HS 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。

36) 重复步骤 35)，再次洗涤。

37) 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。

38) 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

39) 准备 MS Beads:

- a. 用移液枪轻柔吹打混匀 MS Beads，按 MeRIP 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。

- 40) 将步骤 38) 中的样品置于磁力架 2 min, 移液枪转移 50  $\mu$ L 上清到 150  $\mu$ L MS Beads 中, 移液枪吹打混匀。
- 41) 加入 200  $\mu$ L 无水乙醇, 移液枪轻柔吹打混匀, 室温孵育 5 min。
- 42) 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。
- 43) 用无核酸水配置的 75%乙醇漂洗 MS Beads:
- 保持样品始终处于磁力架中, 加入 500  $\mu$ L 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;
  - 重复上述步骤 (a) 一次
- 44) 室温干燥 5 min。
- 45) 用 11.25  $\mu$ L 无核酸水重悬磁珠, 室温孵育 2 min。
- 46) 将 EP 管放置在磁力架上待溶液澄清 (约 2 min)。将 10  $\mu$ L 的上清 (洗脱的 RNA) 转移到新 EP 管中。RNA 样品立即用于后续实验或 -80°C 保存待用。

### 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® $\Psi$ 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    |

## 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 MeRIP 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 MeRIP 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。

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

