



m⁶A RNA 甲基化免疫沉淀套装试剂盒- (m⁶A MeRIP 试剂盒)

货号：PXM6A-D10

产品内容

名称	体积	储存温度
10×RNA 片段化 buffer	20 ul	2-8℃
RNA 片段化终止 buffer	20 ul	2-8℃
3M NaAc	20 ul	2-8℃
Protein G beads	500 ul	2-8℃
m6A 抗体	20 ul	-20℃
Reaction buffer	20 ml	2-8℃
Wash buffer A	10 ml	2-8℃
Wash buffer B	10 ml	2-8℃
洗脱 buffer	500 ul	2-8℃
RNA 酶抑制剂	10 ul	-20℃

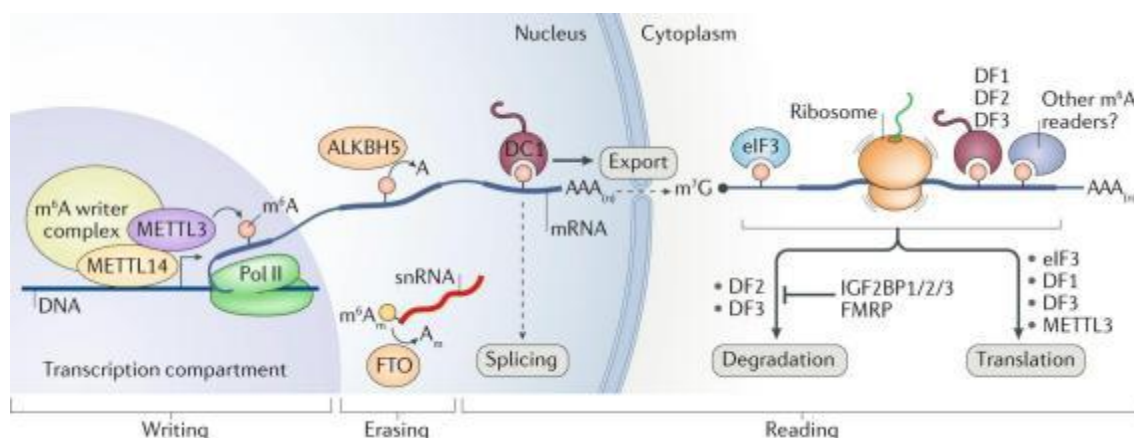
产品简介

m⁶A 修饰是哺乳动物中最丰富的 RNA 表观修饰，同时也是第一个研究相对清楚的 RNA 表观修饰，其将表观遗传学的研究从基因组层面（DNA 和组蛋白的修饰）推向 RNA 层面，是生物学中的一个重要研究前沿和研究热点。

m⁶A MeRIP 分析试剂盒使用 RNA 甲基化免疫沉淀的方法来识别广阔转录组中的 m⁶A。在 RNA 甲基化免疫沉淀分析中，采用化学的方法使 RNA 片段化到 100 左右的核苷酸或更小的片段采用单克隆抗体使得有吸附力的磁珠用免疫沉淀反应将其指向 m⁶A。在免疫沉淀反应之后，分离的 RNA 片段采用 qRT-PCR 或 RNA-测序（RNA-seq）来进行检测。

产品特点

此品非常适合从各种细胞、组织、哺乳动物、真菌、细菌、植物、血浆和血清等样本中提取的总 RNA 和 poly A 富集的 RNA，进行特定基因 RNA 甲基化水平的定量分析。主要检测仪器：实时荧光定量 PCR 仪或测序仪。



操作过程

片段化 RNA:

1) 按照下列体系分别加入试剂:

试剂	体积
10×RNA 片段化 buffer	2 u l
RNA	Total RNA (1 - 50 pg) or mRNA (50 - 250 ng)
RNA 酶抑制剂	0.5 u l
无 RNA 酶水	To 20 u l

- 2) 混合上述试剂, 94°C 片段化 3 min。然后冰上放置, 加入 2 u l RNA 片段终止 buffer。
- 3) 加入 2 u l 3M 的 NaAc 和 125 u l 的无水乙醇, -80°C 放置 2 小时以上。
- 4) 4°C 12000rpm 离心 10min, 沉淀上述片段化后的 RNA, 弃上清后, 75%乙醇洗两遍。10 u l 无 RNA 酶水重新溶解 RNA。
- 5) 留 250 ng 作为 input。 (本试剂盒最少可以进行 1ug total RNA 的片段化并 MeRIP, RNA 总量多效果较好)。

MeRIP:

- 1) 预先混合 protein G 磁珠和 m6A 抗体, 每个样品需要 50 ul protein G beads 和 2 ul m6A 抗体。将混合好的 beads 置于 4°C 中摇晃混匀 1 小时。之后加入 200 ul reaction buffer, 4°C 混匀 5min, 置于磁力架上, 弃掉上清。重复 3 次洗涤。
- 2) RNA 热激: 每个样品的 RNA 加入 0.5 ul RNA 酶抑制剂, 混匀后于 70°C 热激 5 分钟以打开 RNA 的二级结构。
- 3) 将 RNA 加至已经混合好 m6A 抗体的 protein G beads 中, 4°C 混匀 2 小时。
- 4) 然后用 200 ul reaction buffer 4°C 洗涤三次
- 5) 200 ul Wash buffer A 4°C 洗涤三次
- 6) 200 ul Wash buffer B 4°C 洗涤三次
- 7) 磁力架上弃掉上清后, 加入 50 ul 洗脱 buffer, 4°C 混匀 5min, 置于磁力架上, 吸取洗脱液至一个新的 ep 管中。然后用新的 50ul 洗脱 buffer 再洗脱一遍。将两次洗脱液收集在一起。
- 8) 利用 RNA 提取试剂盒提取 RNA。

注意事项

1. 所有的耗材须用无 RNA 酶的耗材。本试剂盒的试剂均进行过去 RNA 酶处理。
2. 所有操作尽量在冰上进行, 以减少 RNA 的降解。
3. MeRIP 对 RNA 损失较大, 最后洗脱的 RNA 尽量用低浓度 RNA 提取试剂提取。
4. 本试剂盒片段化时间为 3 min, 片段化的 RNA 大小约为 200-300nt (满足大部分实验要求)。需要更小片段的 RNA, 可以将时间延长, 最长不超过 5 min。
5. 本试剂盒经优化可以进行低至 1 ug 总 RNA 进行 MeRIP, 但是如果目标 RNA 丰度较低, 建议提高总的 RNA 用量。

参考文献

[1]

Guo X, Li K, Jiang W, Hu Y, Xiao W, Huang Y, Feng Y, Pan Q, Wan R. RNA demethylase ALKBH5 prevents pancreatic cancer progression by posttranscriptional activation of PER1 in an m6A-YTHDF2-dependent manner. *Mol Cancer*. 2020 May 19;19(1):91.

[2]

Wang X, Wu R, Liu Y, Zhao Y, Bi Z, Yao Y, Liu Q, Shi H, Wang F, Wang Y. m6A mRNA methylation controls autophagy and adipogenesis by targeting Atg5 and Atg7. *Autophagy*. 2020 Jul;16(7):1221-1235.

[3]

Zhang T, Zhang SW, Zhang SY, Gao SJ, Chen Y, Huang Y. m6A-express: uncovering complex and condition-specific m6A regulation of gene expression. *Nucleic Acids Res*. 2021 Nov 18;49(20):e116.

[4]

Wang J, Wang K, Liu W, Cai Y, Jin H. m6A mRNA methylation regulates the development of gestational diabetes mellitus in Han Chinese women. *Genomics*. 2021 May;113(3):1048-1056.

[5]

Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, Elemento O, Mason CE, Jaffrey SR. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*. 2012 Jun 22;149(7):1635-46.