



*仅用于实验室，不用于诊断和治疗。请随时跟我们索取并使用最新版本的说明书。

RNA甲基化修饰试剂盒

此品非常适合从细胞与组织等样本中提取的总RNA，进行RNA甲基化修饰操作，整个实验时间仅需3小时。

目录号： A-P-9003（50次、100次）

操作手册 请以英文操作为准！

在您收到订购的产品时，请确认操作手册是配套的！

同时，有翻译不妥的地方还请各位老师批评指正！

反馈信箱：tech@aderr.com

2013年11月，第1版，对应英文第1.0.2.1版



艾德科技(北京)有限公司
A&D Technology Corporation



目录表

产品手册.....	3
试剂盒组成	3
运输和保存	3
配套器材(自备).....	3
说明	4
重点提示	4
一般特性	4
产品简介	5
原理/步骤	6
用法	7
操作手册	7- 8
附录	9
cDNA 合成	9
设置甲基化特异性 qMSP	9
疑难解答	12
订购信息	12
推荐产品	12
如何下单.....	13
推荐阅读.....	12

试剂盒组成

组件	A-P-9005-48(48次)	保存条件
Conversion Buffer	8 ml	常温
Conversion Powder	5 瓶	常温
NA Binding Solution	13 ml	常温
F-Spin Column	50	常温
F-Collection Tube	50	常温
Desulphonation Solution	300 ul	常温
Control Primer-F (10 uM)	10 ul	-20° C
Control Primer-R (10 uM)	10 ul	-20° C
Elution Buffer	1.2 ml	常温
使用手册	1	常温

*在放到微型离心机之前，应将离心柱盖子盖紧。

运输和保存

该试剂盒需加冰袋在4° C运输。

当您收到产品后：1) 需在-20° C储存如下的组件：Control Primer-F and Control Primer-R；剩余的其它组件室温保存。

在合适的保存条件下，所有的产品组件有效期是12个月，自购买之日算起。

配套器材(自备)

- 带盖的热循环仪（由于亚硫酸盐反应没有矿物油，所以只有带加热模块盖子的循环仪适合这个步骤）
- 台式离心机（可达14,000rpm）
- 移液器和洗头
- 1.5 ml 离心管
- 100% 的乙醇
- RNA样本

重点提示

使用必读:

使用: 采用RNA甲基化修饰试剂盒处理得到的转化RNA对于像甲基化特异性PCR, MS-HRM, 和亚硫酸盐测序如: 焦磷酸测序和深度测序是非常理想的。其中总RNA可以是来自哺乳动物, 植物, 真菌, 细菌和病毒等样本中得到的。

RNA输入量: 对于每次亚硫酸盐实验RNA的输入量是5 ng-1 ug. 最为理想的RNA的输入量应该是200 – 500 ng。当使用RNA甲基化修饰试剂盒做甲基化特异性RT-PCR时, RNA的输入量可以少至<10 ng, 但是PCR循环数应该多于45。RNA处理后的得率取决于RNA的输入量, 自然的RNA量和起始材料来源。

起始材料: 非常适合使用各种细胞和组织样本, 比如: 来自培养瓶和微孔板培养的细胞, 新鲜和冷冻的组织, 石蜡包埋组织, 血液, 体液样本等等。

预防措施:

为了避免交叉污染, 接下来的预防措施是非常有必要的。**F-Spin Columns:** 仔细地吸取样本或溶液到 F-Spin Columns。使用灭菌的枪头并在转移完不同的溶液时随时更换。在将 F-Spin Columns 放到微型离心机前始终保证盖子是盖紧的。在整个操作步骤中必须带干净的手套。为了避免手套接触到样本, 应该随时更换手套。

说明

一般特性

质控:

每批RNA甲基化修饰试剂盒的生产, 对既定的各个组件的生产把控, 确保了稳定的产品质量。保证所有产品的性能描述都符合行业的产品标准。A&D Technology Corporation保证所有的产品组件达到如说明书中所描述的功能。

质量保证:

此品如果没有达到您的实验期望, 可以给我们的技术发送邮件到: tech@aderr.com。我们也鼓励您随时与我们联系, 如果您有任何意见或新的应用领域及产品性能和技术。

安全:

对于实验人员工作时, 实验室应配备安全的外套, 一次性手套, 和适当的防护眼罩

产品更新:

A&D Technology Corporation有权更改或修改任何产品, 以提高其性能和设计。这个操作指南的信息是可能随时变更, 恕不另行通知。因此, 此使用指南仅为提供此品用户时配套使用。

使用限制:

RNA甲基化修饰试剂盒是为研究用途, 不适合诊断或治疗的应用。

知识产权:

RNA甲基化修饰试剂盒中使用的原理和方法, 我司有产品使用的追索权。

【艾德科技】定货热线: +86-10-52406250

技术支持: tech@aderr.com

产品简介

最新报道，5-甲基胞嘧啶（5-mC）不仅广泛的存在于基因组 DNA 中，在 RNA 中也普遍存在。但是，RNA 甲基化的功能仍不清楚。有些研究认为 RNA 甲基化在翻译调控中起着重要作用，而有些研究认为其在 RNA 的稳定性及结构中起着重要作用。在人类中，5-mC 会出现在各种不同形式的 RNA 分子上，包括 tRNAs, rRNAs, mRNAs, 非编码 RNA(ncRNAs)等。至少有 10275 个的 5-mC 候选位点被发现在 mRNAs 和 ncRNAs, 它覆盖了 10.6% 残留在转录组的总胞嘧啶。5-mC 似乎浓缩在某些类型的 ncRNA, 但相对缺乏 mRNAs。然而，绝大多数(83%)的候选位点中发现在 mRNAs。在这些转录组上，5-mC 似乎耗尽在蛋白质编码序列，且浓缩在 5'和 3'UTRs。两个不同的甲基转移酶，NSUN2 和 DNMT2 已知催化 5-mC 修改在真核生物的 RNA。最近强有力的数据表明，RNA 胞嘧啶甲基化作用影响着调节各种生物过程，如 RNA 稳定性与信使核糖核酸（mRNA）的翻译。此外，损失 5-mC 在 vault RNAs 导致异常的处理成 Argonaute-associated 小 RNA 片段，可以作为小分子核糖核酸（即 microRNA）。因此，受损的处理的 vault ncRNA 可能与导致人类疾病的病因 NSUN2-deficiency 人类疾病相关。亚硫酸氢盐转化 RNA, 紧接着是 RT-PCR 扩增、克隆和可信的测序分析，来收集可靠的关于 RNA 胞嘧啶甲基化状态的信息，变得尤为重要。由于 RNA 的不稳定性，导致对于 RNA 的研究十分困难。为此，我公司给您强烈推荐 RNA 甲基化修饰试剂盒，解决了如上的问题。该产品包括了进行修饰所有必要组件，独特设计的混合液配方包含了 RNA 的保护剂，以防降解。这样有效保证了胞嘧啶转化成尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶几乎不受影响。

无毒的 RNA 紧紧的结合在离心柱基质上，RNA 可以有效去除残余的亚硫酸氢盐和，得到纯净的修饰 RNA。洗脱后的 RNA 可以用于做 qMSP（即 RT-PCR），克隆，MS-HRM 和测序分析（如：焦磷酸分析和深度测序）等各种 RNA 甲基化后续实验分析。产品功能简介如下：

	Unmethylated RNA	Methylated RNA
Original Sequence	C-C-U-C-G-A-C-U	C-C-U ^{Me} -C-G-A ^{Me} -C-U
After Bisulfite Conversion	U-U-U-U-G-A-U-U	U-U-U ^{Me} -C-G-A ^{Me} -C-U

有效且高效地准备转化好的 RNA 用于各种下游实验分析。

A&D Technology Corporation 与合作伙伴 EPI 合作开发的 RNA 甲基化修饰试剂盒。这个工具是为亚硫酸氢盐转化和验证 RNA 而设计的，具有如下的优势和特性：

- 快速简便的操作流程仅需 3 小时
- 将未甲基化的 RNA 胞嘧啶（C）完全转化为尿嘧啶（U），转化率>99.9%；不当或错误的转化率<0.1%（甲基化胞嘧啶转化成胸腺嘧啶）。
- 强给力的 RNA 保护剂有效防止了 RNA 的降解，保护了>90%的 RNA。
- 包括的对照引物是专门针对特异转化后的 RNA 设计的，可以用来测试其是否完全正确的实现了亚硫酸盐转化。
- 可用于亚硫酸盐转化的 RNA 低至每次反应 5 ng
- 简单、可信和实验条件始终如一。

【艾德科技】定货热线：+86-10-52406250

技术支持：tech@aderr.com

参考文献:

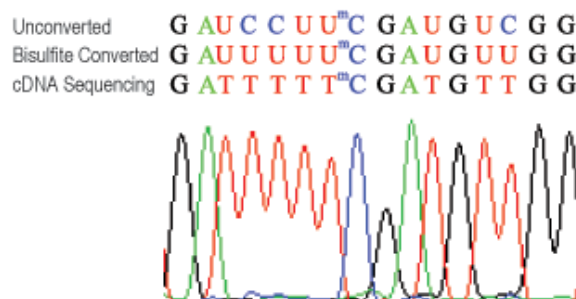
1. Niu Y et al: Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 11:2013.
2. Cantara WA, et al. NucleicAcids Res. 2011; 39: D195-201.
3. Motorin Y, Helm M.Nucleic Acids Res. 2010;38(5): 1415-1430.
4. Squires JE, Preiss T.Epigenomics. 2010; 2(5):709-715.
5. Chow CS, et al. ACSChem Biol. 2007; 2(9): 610-619.
6. Baudin-Baillieu A, et al.Nucleic Acids Res. 2009;37(22): 7665-7677
7. Alexandrov A, et al. MolCell. 2006; 21(1): 87-96.
8. Schaefer M, et al. GenesDev. 2010; 24(15): 1590-1595.
9. Helm M. Nucleic AcidsRes. 2006; 34(2): 721-733
10. Motorin Y, Helm M.Biochemistry. 2010; 49(24):4934-4944.

原理/步骤

RNA甲基化修饰试剂盒包括了所有定性修饰总RNA样本的必要试剂。独特转化试剂包含了RNA保护剂，有效防止了化学试剂和嗜热试剂的降解。这样提高了胞嘧啶转化为尿嘧啶的效率，胞嘧啶脱氨基作用可以忽略不计。无毒的RNA捕获溶液增强了RNA结合在柱基质上的能力，这样转化后的RNA可以有效地被洗脱同时将亚硫酸氢盐和盐分彻底清除。更值得一提的是，在这个试剂盒中我们配套的提供了一对特异性的甲基化引物，极大地方便了您进行qMSP（甲基化定量PCR）分析。



图示：RNA 甲基化修饰试剂盒



RNA 测序分析。从 MCF-7 细胞中提取 RNA，经亚硫酸盐处理。针对处理后的 RNA，使用 28s RNA 引物特异扩增后，合成 cDNA 并测序。未甲基化的 C(#4、#5、#14)转化成 U，经扩增 T 后，测序检测。而甲基化的 C(#8)仍保持不变。

用法

操作手册

为了得到最好的实验结果，在实验开始前，请通读这个操作手册。

起始材料：

RNA输入量：RNA每次反应量范围在5 ng-1 ug。最佳输入量是每次200 – 500 ng。起始的RNA应该是在水中或是溶液中比如：TE。RNA应该是高质量的并无或很少DNA的污染。可以使用DNase I 去除DNA。你可以使用自己的办法来提取RNA。当然，此手册后附有RNA提取的相关产品。

RNA储存：提取好的RNA可以储存在-20° C（短期）或是在-80° C（长期）直到使用为止。

1. 溶液和试剂制备：

a. 制备转化溶液：

添加1.4 ml 的 Conversion Buffer 和 40 ul 的 Desulphonation Solution 到1瓶 Conversion Powder得到转化液。通过 **WB**（10X Wash Buffer）到117 ml 的蒸馏水（最终pH7.2-7.5）中。

96次试剂盒：添加26 ml 的 **WB**（10X Wash Buffer）到234 ml 的蒸馏水（最终pH7.2-7.5）中。这个**稀释的WB** 1X Wash Buffer现在可以储存在4° C可达6个月。

b. 通过添加 3 ml 的蒸馏水到7 ml 的 100 % 乙醇来制备 70 % 的乙醇。

c. 通过添加 1 ml 的蒸馏水到9 ml 的 100 % 乙醇来制备 90 % 的乙醇。

d. 制备desulphonation buffer的工作液：

首先，以1:12比例稀释 **Desulphonation Solution**（如：添加 5 ul的**Desulphonation Solution**到55 ul的蒸馏水中）。其次，添加 2 ul 的稀释的**Desulphonation Solution** 到每个1 ml 的 90 % 乙醇，并混合。

2. RNA亚硫酸盐处理：

a. 添加 100 ul 的转化液到PCR管子中，然后添加2-10 ul 的RNA样本。

在-20° C制备好的转化液可以储存2周，效率没有下降。为了得到更好的结果，建议立即使用混合液。

b. 紧紧的盖上PCR管子并将它放进带盖的热循环仪。设置并执行循环仪。

温度	时间
65° C	5 分钟
60° C	90 分钟
4 ° C	长达16小时

同时，根据你实验的需要数量，预先将F-Spin Columns 放进 F-Collection Tubes。

3. 转化后 RNA纯化：

- 添加 250 ul 的**NA Binding Solution** 到每个柱子中，然后从每个PCR管子（从第2b步）中转移样本到装有**NA Binding Solution**的柱子中。以12,000 rpm 离心1分钟。从收集管上移走柱子并丢弃滤出液。再次将柱子放回到收集管中。
- 添加 200 ul 70%的乙醇到柱子中。以12,000 rpm 离心1分钟。
- 添加 200 ul 的工作液（**Desulphonation Solution**和 90 % 乙醇混合）到每个柱子中。室温容许柱子放置30分钟，然后以12,000 rpm 离心1分钟。从收集管上移走柱子并丢弃滤出液。再次将柱子放回到收集管中。
- 添加 200 ul 的 90% 乙醇到每个柱子中。以12,000 rpm 离心1分钟。从收集管上移走柱子并丢弃滤出液。再次将柱子放回到收集管中。再次添加 200 ul 的 90% 乙醇到每个柱子中并12,000 rpm 离心1分钟。
- 将每个柱子套在新的1.5 ml 管子中。直接添加10-20 ul 的**Elution Buffer** 到柱基质上。以12,000 rpm 离心1分钟来洗脱转化的RNA。

现在，转化的RNA可以用来使用，或储存在-20° C达2个月。正如转化的RNA不是很稳定，在进行下一个应用程序或储存前，我们推荐从转化的RNA进行cDNA的合成。参考附录1中cDNA的合成。

附录

1. cDNA合成

你可以使用你自己的方法来合成cDNA。为了实验便利，A&D Technology Corporation提供了高保真cDNA合成试剂盒（货号：A-P-9004），它是经过优化和验证的，与亚硫酸盐处理的RNA是互补的。

a.在冰上添加如下的内容到0.2 ml PCR管中：

组件	数量
Bisulfite-converted RNA (200-500 ng)	10 ul
Random primer (50 uM)	1 ul
10 mM dNTP mix	1 ul

b.在热循环仪上65° C热激3分钟。立刻在冰上放置至少1分钟。

c.在冰上添加如下的内容到管子中：

5X RT Reaction Buffer	4 ul
0.1M DTTI	2 ul
RNase Inhibitor	1 ul
RT Enzyme Mix	1 ul
Total Volumn	20 ul

涡旋样本进行简单混合，通过短暂离心，收集。孵育如下：42°C 45分钟，紧接着80°C 5分钟(不加热盖)。

在-20° C储存合成cDNA反应液，或直接进行下一个应用程序，如甲基化特异性PCR（参考附录2中的甲基化特异性qPCR）或甲基化测序等。

2.设置甲基化特异性qPCR

当使用甲基化特异性PCR时，我们推荐使用快速MS-qPCR试剂盒（货号：A-P-1028），它包含优化的热启动酶系统并减少了甲基化特异性qPCR的时间。2x浓度预混的酶只需添加引物和模板，即可以进行PCR反应。在这个试剂盒中，qMSP仅需要70分钟即可完成。

准备PCR反应：

组件	Size(ul)	终浓度
Methylamp Master Mix (2X)	10 ul	1X
Forward Primer	1 ul	0.4-0.5 .M
Reverse Primer	1 ul	0.4-0.5 .M
cDNA Template	1-2 ul	50 pg-0.1 ug
RNase-free H ₂ O	6-7 ul	
Total Volume	20 ul	

对于阴性对照，可以使用RNase-free water 代替 cDNA模板。

PCR反应程序

循环设置	温度	时间	循环数
Activation	95° C	7 分钟	1
Cycling	95° C	10 秒	40-45
	55° C	10 秒	
	72° C	8 秒	
Final Extension	72° C	1 分钟	1

疑难解答

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
在阳性对照和样本孔中无信号	试剂被不正确的加入	确保试剂加入的恰当顺序，可能在操作中省略的任何步骤。
	在 RNA 结合前孔被不当的清洗	确保在添加阳性对照和样本前，孔不被清洗。
	孔的底部没有被 BS（结合液）完全覆盖	通过从一边到另一边轻柔的或轻轻的摇晃板子几次来让溶液覆盖孔的底部。
	孵育时间和温度不正确	确保孵育时间和温度像操作手册中描述的被正确的加入。
	不正确的材料输入	确保足够的阳性对照（>0.2 ng）和样本（200 ng）被加入到孔中。
	不正确的读取吸光值	检查酶标仪是否采用恰当的波长（450 nm）读取。
仅 PC（阳性对照）孔中无信号或微弱信号	试剂盒被不恰当储存或不当的处理	确保试剂盒所有的组件是采用恰当的温度储存并在每次使用完后将盖子盖紧。
	在第 3c 步没有添加足够的 PC（阳性对照）到孔中	确保添加足够的 PC（阳性对照）。
在阴性对照孔中存在高背景	由于不恰当的储存条件导致 PC（阳性对照）降解	遵守操作手册中对于 PC（阳性对照）运输和储存条件的说明。
	没有足够的清洗孔	根据操作手册检查是否每一步都进行了清洗。
	样本或阳性对照受到污染	确保孔没有被样本或阳性对照或来自任何吸头的污染。
	孵育时间太长	确保在第 3d 步中孵育时间没有超过 2 小时。



	过度显色	在第 5b 步中添加 SS （阻止液）减少第 5a 步中的显色时间。
仅在样本孔无信号或微弱信号	不正确的提取或纯化 RNA	确保 RNA 样本是高质量的。260/280 比值应该>1.9 且无或很少 DNA 的污染。
	加入到孔中的样本量不够	确保在第 3c 步骤中使用了足够的 RNA 数量。
	样本中包含很少或无 m ⁶ A	N/A
过度的显色时间	孔没有足够的清洗净	根据操作手册确保清洗干净孔。确保清洗缓冲液的残留尽可能的清洗干净。
	延迟显色或阻断孔的显色	确保显色溶液或阻断溶液是按照顺序加入的，并采用与操作手册一致的顺序添加其他的试剂（如：从孔 A 到 G 或从孔 1 到孔 12）。



订购信息

货号	品名	规格
A-P-9003	RNA 甲基化修饰试剂盒	50 次、100 次
A-P-9005	m6A RNA 甲基化定量检测试剂盒(比色法)	48 次、96 次
A-P-900X	m6A RNA 甲基化定量检测试剂盒(荧光法)	48 次、96 次
A-R5001	EZ RNA 甲基化修饰试剂盒	50 次
A-R5002	EZ RNA 甲基化修饰试剂盒	200 次

推荐产品

RNA 和 microRNA 样本的制备:

货号	品名	规格
A-R1202	A&D TRIpure 高纯总 RNA 快速提取试剂盒（离心柱）	50 次、100 次
A-RH110	细胞/组织总 RNA 提取试剂盒（离心柱）	50 次、200 次
A-R5311	石蜡包埋组织 microRNA 快速提取试剂盒（离心柱）	50 次、100 次
A-R4002	A&D 血液总 RNA 快速提取试剂盒（液体样本,离心柱）	50 次、100 次
A-RH710	血液总 RNA 小量提取试剂盒（离心柱）	50 次、200 次
A-R5908	血液（液体样本）microRNA 快速提取试剂盒 III 型（柱型）	50 次、100 次
A-R3202	多糖多酚植物总 RNA 快速提取试剂盒（离心柱）	50 次、100 次
A-R3302	A&D 通用植物总 RNA 提取试剂盒（离心柱型）	50 次、100 次
A-RH130	植物总 RNA 提取试剂盒（离心柱）	50 次、200 次
A-R5331	通用植物 microRNA 快速提取试剂盒（柱型）	50 次、100 次

特定基因 DNA 甲基化定性定量试剂盒和全基因组 DNA 甲基化定量试剂盒:

货号	品名	规格
A-P-1016	DNA 甲基化直接修饰试剂盒	40 次、80 次
A-P-1026	DNA 甲基化极速修饰试剂盒	50 次、100 次
A-P-1028	快速 MS-qPCR 试剂盒	100 次、200 次
A-P-1029	Epiquick qPCR 快速试剂盒	100 次、200 次
A-P-1034	DNA 甲基化定量检测试剂盒(比色法)	48 次、96 次
A-P-1035	DNA 甲基化定量检测试剂盒(荧光法)	48 次、96 次
A-P-1036	DNA 羟甲基化定量检测试剂盒(比色法)	48 次、96 次
A-P-1037	DNA 羟甲基化定量检测试剂盒(荧光法)	48 次、96 次

相关产品

货号	品名	规格
A-P-9004	高保真 cDNA 合成试剂盒	50 次、100 次
A-BC121	DNase I(RNase-free)(2 U/ul)	2000U、10000U
A-RH113	总 RNA 提取试剂盒	50 次、200 次
A-RQ110	A&D Pur-zol™ Reagent	100ml、200ml
A-E2001	ZymoTaq DNA Polymerase	50 次、200 次



如何下单

1. 电话，传真或邮件订购：

技术电话：010—57225208；传真：010—52406250；

邮件：ordering@aderr.com

2. 在线定单订购：

<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1771&t=1474>

推荐阅读

1. RNA 甲基化修饰和定量？惊呆了我和小伙伴们!!!

<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1349&t=3606&id=30829>

2. A&D Technology Corporation 解码神秘的 RNA 第 5 个碱基---m6A(N6-methyladenosine)

<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1349&t=3606&id=30227>

3. 艾德科技史上最全表观遗传学产品线与服务，让你的研究冰爽一“夏”！

<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1349&t=3606&id=27858>

4.“新四大碱基”的确定，对于生物学研究者的几点启示！

<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=2566&t=3623&id=21290>

5. 科学家发现新型 DNA-microDNA！

<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1349&t=3606&id=20763>

6. 艾德科技为您提供“一站式”的产品与服务！

<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1349&t=3606&id=20739>

7. A&D Technology Corporation 长期供应下一代超高敏测序系列产品！

<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1349&t=3606&id=30108>



艾德科技（北京）有限公司
一站式采购 www.aderr.com 实验室好伙伴



艾德科技（北京）有限公司
A&D Technology Corporation

地 址：北京昌平区中关村生命科学园东 60 米（102206）

电 话：010-52406250

传真：010-52406250

网 址：www.aderr.com

Email:tech@aderr.com