



\*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。

## EpiNext高保真cDNA 第一链合成试剂盒

此品非常适合针对甲基化修饰的后RNA进行反转录，时间短，效率高！

目录号： A-P-9004 (20次、40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](mailto:tech@aderr.com)

2013年11月，第1版，对应英文第1.2.2.3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 .....	3
重点提示 .....	3
一般特性 .....	4
推荐的 RNA 处理试剂盒简介 .....	5
推荐的 RNA 处理试剂盒原理/步骤 .....	6
用法 .....	7
操作手册 .....	7
附录 .....	8
疑难解答 .....	9
订购信息 .....	10
推荐产品 .....	10
如何下单 .....	11
推荐阅读 .....	10

## 试剂盒组成

组件	A-P-9004-20(20次)	保存条件
5x RT Reaction Buffer	100 ul	-20° C
10 mM dNTP Mix*	25 ul	-20° C
0.1M DTT*	50 ul	-20° C
Rnase Inhibitor *	25 ul	-20° C
Random Primer(50 uM)*	25 ul	-20° C
RT Enzyme Mix*	25 ul	-20° C
使用手册	1	常温

\*在使用前，应将溶液离心至管底。

## 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，需立刻在-20° C储存所有组件。

在合适的保存条件下，所有的产品组件有效期是6-12个月，自购买之日算起。

## 配套器材(自备)

- 无盖的热循环仪
- 台式离心机（可达14,000rpm）
- 移液器和洗头
- 0.2ml PCR管
- 1.5 ml 离心管
- RNA样本

## 重点提示

使用必读：

**使用：**采用EpiNext高保真cDNA 第一链合成试剂盒对于修饰后的RNA特异的合成DNA的拷贝数和富集RNA片段是非常理想的。这个试剂盒使用总RNA对于cDNA的合成也是非常适合。合成的DNA对包括PCR和cDNA文库制备等很多下游实验也非常适用。试剂盒包括的反转录酶本身含有很低的核糖核酸酶活性，可以高效保证反转录的精确进行和全长cDNA链的合成。



**RNA输入量:** 对于每次反转录实验RNA的输入量是0.1 ng-2 ug.最为理想的RNA的输入量应该是200 – 500 ng。（对于RNA修饰时的提示：当使用RNA甲基化修饰试剂盒<Cat no.A-P-9003>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。在吸取样本或溶液时小心的将枪头进行更换。使用灭菌的枪头并在转移完不同的溶液时随时更换。在将 PCR 管放到 PCR 仪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，应该理科更换手套。

## 说明

### 一般特性

#### 质控:

每批EpiNext高保真cDNA 第一链合成试剂盒的生产,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](mailto: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:

EpiNext高保真cDNA 第一链合成试剂盒是为研究用途,不适合诊断或治疗的应用。

#### 知识产权:

EpiNext高保真cDNA 第一链合成试剂盒中使用的原理和方法,我司有产品使用的追索权。

## 产品描述

从 RNA 中高效率制备的 cDNA 可以确保包括实时荧光定量 PCR 和 RNA/cDNA 测序等下游实验时得到可信的数据。EpiNext 高保真 cDNA 第一链合成试剂盒对于从各种 RNA 样本中，尤其是从亚硫酸盐处理后的 RNA 和富集的 RNA 片段是非常理想的和已经验证过的。试剂盒包含的所有组件拥有高效而良好的耐热性，对于提供的增强的 cDNA 第一链，可保真地而



广泛地保证活性，RNA 模板的范围是：0.1ng-2ug。也可重组，并进行反转录。通过 rRNA 和 tRNA 使其具有高效的热稳定性，低核糖核酸酶活性和抗抑制性；试剂盒中包括的重组反转录酶可将总 RNA 和高 GC 含量模板如亚硫酸盐转化的 RNA 在 42° C -60° C 中进行很好的全长片段的 cDNA 链合成。试剂盒中包含的一种重组的核糖核酸酶抑制剂可有效地防止因核糖核酸酶污染导致目标 RNA 的降解。

## 推荐的 RNA 甲基化前处理试剂盒简介

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 候选位点被发现存在于 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 紧紧的结在离心柱基质上，RNA 可以有效去除残余的亚硫酸氢和盐，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 <sup>M</sup> C-G-A <sup>M</sup> C-U
After Bisulfite Conversion	U-U-U-U-G-A-U-U	U-U-U <sup>M</sup> C-G-A <sup>M</sup> 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

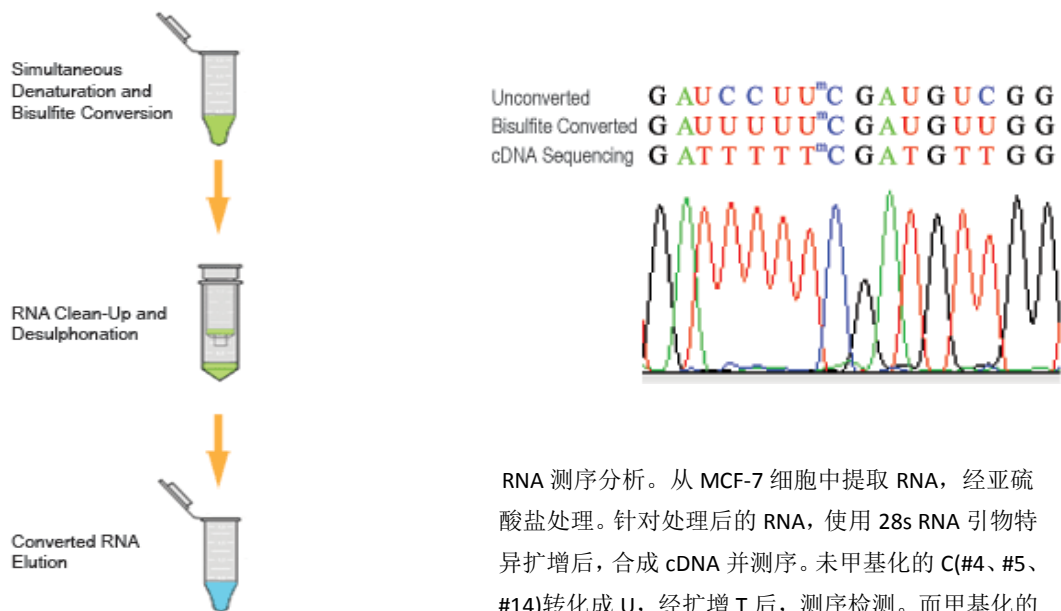
- 将未甲基化的 RNA 胞嘧啶 (C) 完全转化为尿嘧啶 (U)，转化率>99.9%；不当或错误的转化率<0.1% (甲基化胞嘧啶转化成胸腺嘧啶)。
- 强给力的 RNA 保护剂有效防止了 RNA 的降解，保护了>90%的 RNA。
- 包括的对照引物是专门针对特异转化后的 RNA 设计的，可以用来测试其是否完全正确的实现了亚硫酸盐转化。
- 可用于亚硫酸盐转化的 RNA 低至每次反应 5 ng
- 简单、可信和实验条件始终如一。

### 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.

## 推荐的 RNA 甲基化前处理试剂盒原理/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

【艾德科技】定货热线：+86-10-52406250

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。

技术支持：[tech@aderr.com](mailto:tech@aderr.com)

## 用法

### 操作手册

为了得到最好的实验结果，在实验开始前，请通读整个操作手册。

#### 1. 起始材料:

**RNA输入量:** RNA每次反应量范围在0.1 ng-2 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并将RNA洗脱在无DNA和RNA的水中，通常是RNase-free water。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。

#### 2. 合成cDNA:

a. 添加如下到放置在冰上的0.2ml PCR管:

组件	体积
RNA(200-500ng)	10 ul
Random Primer(50 uM)	1 ul
10 mM dNTP Mix	1 ul

b. 放在无盖的热循环仪上65° C热激3分钟。立刻放置在冰上至少1分钟。

c. 添加如下到放置在冰上的管:

组件	体积
5x RT reaction buffer	4ul
0.1M DTT	2ul
Rnase inhibitor	1 ul
RT enzyme mix	1 ul
Total Volume in tube	20 ul

简单的旋转样本来进行混合并使用离心机来收集。按照如下温度来孵育：42° C 45分钟；接着是80° C 5分钟（无需盖子）。

储存合成的cDNA反应液在-20° C，或直接进行下一个应用程序如qPCR(看附录“qPCR工作流程”)或RNA/cDNA测序。

## 附录

### qPCR工作流程

当使用特异性qPCR时，我们推荐使用快速qPCR定量试剂盒（货号：A-P-1029），它包含优化的热启动酶系统并减少了非特异性qPCR的扩增。2X 浓度预混的酶只需添加引物和模板，即可以进行qPCR反应。在这个试剂盒中，qPCR仅需要70分钟即可完成。

#### 准备PCR反应：

组件	Size(ul)	终浓度
Master Mix (2X)	10 ul	1X
Forward Primer	1 ul	0.4-0.5 uM
Reverse Primer	1 ul	0.4-0.5 uM
cDNA Template	1-2 ul	50 pg-0.1 ug
RNase-free H <sub>2</sub> O	6-7 ul	
<b>Total Volume</b>	20 ul	

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

#### 设置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
很少或无 cDNA 合成	RNA 量很少 (RNA 严重降解)	检查样本 RNA 的 260/280 比值是在 1.9-2.0 间。通过凝胶来检测 RNA 的完整性。
	RNA 中包含反转录抑制剂	常见的核糖核酸抑制剂如 SDS、EDTA 和甲酰胺可以采用乙醇将 RNA 再次沉淀和清洁。
	温度设置不正确	对于 cDNA 的合成检查温度设置是否恰当。
	起始 RNA 数量不足	增加起始 RNA 的数量，尤其是针对从总 RNA 提出来的低拷贝的基因。
	试剂盒不恰当的储存和处理	确保试剂盒所有的组件在 -20° C 保存。
qPCR 中很少特异性	非特异性引物	PCR 引物被不恰当的处理或不正确的设计。确保引物是专门针对目的基因特异性设计的。
	基因组 DNA 的污染	使用 DNase I 对 RNA 进行处理并再次纯化。



## 订购信息

货号	品名	规格
A-P-9004	高保真 cDNA 合成试剂盒	20 次、40 次
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 少量提取试剂盒(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-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](mailto: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](http://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](http://www.aderr.com)

Email:[tech@aderr.com](mailto:tech@aderr.com)