



*仅用于实验室，不用于诊断。请随时跟我们索取并使用最新版本的说明书。

EpiNext RNA甲基化极易测序试剂盒 (illumina)

此品非常适合从各种培养细胞(烧瓶或微孔板)、组织(新鲜或冷冻)、显微切割样本、哺乳动物、真菌、细菌、植物、体液样本、血浆和血清等样本中提取的RNA，进行亚硫酸盐处理后，基于illumina平台的RNA整体甲基化测序分析和各种NGS分析。主要测序分析平台：illumina仪器。

目录号： A-P-9007 (12次、24次)

操作手册 **英文操作手册为准！中文为辅！**

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

2016年06月，第1版，对应英文第0.6.2.0版





目录表

试剂盒组成	3
运输和保存	3
配套器材(自备)	4
重点提示	4
说明	5
一般特性	5
产品简介	6
原理/步骤	8
用法	9
操作手册	9
为了得到最好的实验结果，在实验开始前，请仔细地通读这个操作手册。	9
凝难解答	14
订购信息	15
推荐产品	15
相关产品	16
如何下单	16

试剂盒组成

内容	A-P-9007-12 (12次)	A-P-9007-24 (24次)	保存条件
Conversion Buffer	3 ml	6 ml	常温
Conversion Powder	2 瓶	4 瓶	常温
NA Binding Solution	6 ml	12 ml	常温
F-Spin Column**	15 个	30 个	常温
F-Collection Tube	15 个	30 个	常温
Desulphonation Solution	100 ul	200 ul	常温
5X Reaction Buffer *	100 ul	200 ul	-20° C
Reaction Enzyme Mix*	50 ul	100 ul	-20° C
Adaptor-A (10uM)*	28 ul	56 ul	-20° C
Adaptor-B (10uM)*	28 ul	56 ul	-20° C
RNA Digestion Buffer	30 ul	60 ul	-20° C
RNA Digestion Enzyme *	15 ul	30 ul	-20° C
MQ Binding Beads*	1.8 ml	2X(1.8ml)	4° C
2X HiFi PCR Master Mix*	12 ul	24 ul	-20° C
Primer U (10uM)	15 ul	30 ul	-20° C
Primer I (10uM)	15 ul	30 ul	-20° C
Elution Buffer *	1000 ul	2000 ul	-20° C
使用手册	1	1	常温

*在使用之前将溶液离心至管底。

**在将离心柱放置在离心机之前，始终保证盖子盖紧。

运输和保存

该试剂盒分二部分运输，第一部分是在室温环境下；第二部分需在4° C加冰袋运输。

当您收到产品后：1) 需将**5X Reaction Buffer**、**Reaction Enzyme Mix**、**Adaptor-A**、**Adaptor-B**、**RNA Digestion Buffer**、**RNA Digestion Enzyme**、**2X HiFi PCR Master Mix**、**Primer U**、**Primer I**和**Elution Buffer** 在-20° C下保存；2) **MQ Binding Beads**在4° C保存；

3) 剩余的组件室温避光保存。

注意：在合适的保存情况下，所有的产品组件有效期至少是6个月，自购买之日算起。

配套器材(自备)

- 涡旋混合器
- 安捷伦的生物分析仪或类似的方法来评估DNA文库的质量
- 热循环仪
- 台式离心机（最大速度可达14,000rpm）
- 磁力架（96孔板设计）
- 可调移液器和吸头
- PCR管子或板子
- 1.5 ml 离心管(需要灭菌处理)
- 100%的乙醇
- RNA样本（我公司也有配套的，具体咨询QQ：1951545998或微信号：hugasis）
- 蒸馏水

重点提示

使用必读：

使用：EpiNext RNA甲基化极易测序试剂盒（illumina）专门为方便执行RNA亚硫酸盐处理转化，紧接着是基于illumina的亚硫酸盐测序平台来进行的文库制备，一个试剂盒全搞定。预期的程序包括全转录组RNA亚硫酸盐测序和各种针对RNA甲基化的分析测序技术如：基于二代测序（NGS）的RNA亚硫酸盐分析。这个试剂盒的操作手册和组件容许亚硫酸盐转化的RNA和随机的片段化，紧接着使用亚硫酸盐转化的低-ng级别的RNA进行快速的非条形码（singleplexed）和条形码（multiplexed）的文库构建。

RNA输入量：起始材料可以是来自各种组织/细胞样本例如：新鲜和冷冻的组织、在培养瓶或微孔板培养的细胞、显微切割的样本和体液样本等等。对于每次亚硫酸盐实验RNA的输入量是5ng-500 ng。最为理想的RNA的输入量应该是100ng-200 ng。在亚硫酸盐纯化后得到RNA的得率取决于RNA的输入量，本身的含量和起始材料的来源。

预防措施：

为了避免交叉污染，对于本试剂盒中的柱子和管子，需要采取必要的预防措施。小心的吸取样本或将溶液添加到柱子或是管子中。使用带滤芯的吸头，并且在不同溶液的转移中，要及时的更换枪头。在整个实验操作过程中，建议戴上手套。在将离心柱放置在离心机上时，应该保证柱子盖紧盖子。如果手套与样本有接触，应该立即更换新的手套。



说明

一般特性

质控:

每批EpiNext RNA甲基化极易测序试剂盒（illumina）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; 或加QQ: 1951545998咨询。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 RNA甲基化极易测序试剂盒（illumina）是为研究用途,不适合诊断或治疗的应用。

知识产权:

EpiNext RNA甲基化极易测序试剂盒（illumina）中使用的原理和方法,我司有产品使用的追索权。

产品简介

在 DNA 中 5-甲基胞嘧啶通过 DNA 甲基转移酶甲基组的同价原理发生在胞嘧啶环的第五位碳原子上。这个过程很好地被研究并且通常伴随有基因的表达和抑制。尤其是在人类中观测到，5-甲基胞嘧啶发生在各种形式的 RNA 分子中，包括 tRNAs, rRNAs, mRNAs 和非编码 RNAs (ncRNAs)。5-甲基胞嘧啶看起来都富集于 ncRNA 这类中，但是相对的在 mRNAs 中是在减少。5-甲基胞嘧啶的水平在动物基因组中是不一样的，水平量在一些昆虫中不被发觉的到在人类细胞中大概有 0.1-0.45% 的总 RNA 量。大多数 (83%) 的 5-甲基胞嘧啶是在 mRNAs 中发现的。在这些转录中，5-甲基胞嘧啶在蛋白编码测序中出现减少；而在 5' 和 3' UTRs 中出现富集。众所周知，2 种不同的甲基转移酶，NSUN2 和 DNMT2 在真核生物 RNA 中通过催化 5-甲基胞嘧啶的修饰形式，会减少 5-mC。现在已经有很有力的证据表明：RNA 胞嘧啶的甲基化影响着各种生物进化的规则例如：RNA 稳定性和 mRNA 翻译。此外，在拱形 RNAs 中 5-mC 的缺失会异常的引起相关的小 RNA 片段化且这些小 RNA 发挥着正常的功能。因此，拱形 ncRNA 的损失可能有助于发现人类因缺失 NSUN2 而引起的发挥失调。

推荐您扩展阅读如下内容：众所周知，在真核生物中，m6A (N6-methyladenosine) 是在 RNA 分子中最常见的和丰富存在的。这种修饰是由 m6A 催化甲基转移酶复杂 METTL3 和最近发的 m6A RNA 去甲基转移酶如 FTO 和 ALKBH5，这种 m6A RNA 去甲基是以 α -ketoglutarate m6A (α -KG)-和 Fe^{2+} 方式进行的。结果表明，在许多生物过程中，如从生命发展和代谢生育，METTL3, FTO 和 ALKBH5 扮演着重要角色。超过 80% 的 m6A 是以 RNA 甲基化的形式存在于不同的物种。m6A 主要分布在 mRNA 和也发生在非编码 RNA (ncRNA) 如 tRNA, rRNA 和 snRNA。相对丰富的 m6A 在 mRNA 转录时已经表明影响核糖核酸代谢过程，如拼接，核出口，翻译能力和稳定性，RNA 转录。异常甲基化水平的 m6A 诱导缺陷甲基化酶和 m6A RNA 去甲基酶可能导致 RNA 功能障碍的和疾病发生。例如，异常低水平在正常 m6A 目标由于增加患者 FTO 活动、FTO 基因突变，通过迄今还未通路，导致了肥胖和相关疾病的发作。动态和可逆化学 m6A 修饰，在 RNA 中也可以作为一种新颖的表观遗传标记的生物学，意义深远可以预见。因此，更多的有用的信息，更好理解 m6A RNA 甲基化水平和分布对 RNA 转录、诊断和治疗疾病非常有益。

该产品中，总 RNA 必将结合在微孔板上，使用一种高特异性的 RNA 溶液方案。使用特异性较强的捕获抗体和检测抗体来分析 m6A。检测产生的增强信号，然后通过读取在微型板分光光度计波长为 450 nm 处吸光度进行比色定量。m6A 的数量与测量的 OD 值强度是成正比的。在这个试剂盒中包括阳性和阴性对照。绘制标准曲线（范围：0.02 到 1 ng 的 m6A）或单点对照的 m6A 可以用作阳性对照。因为 m6A 的含量，在不同的组织，正常和病变的部位，或在处理过以及未处理的条件下，我们建议运行 2 份样品，以确保信号生成的可信心性。这套解决方案将允许研究人员选择定量一个绝对数量的 m6A 或确定相对 m6A RNA 甲基化状态的两个不同的 RNA 样品。

该款产品拥有一套完整的优化缓冲液和试剂体系，可以采用比色或荧光法来定量总 RNA 中的 m6A (N6-methyladenosine)。对于总 RNA (从哺乳动物，各种组织或细胞样本如像培养瓶和培养皿培养的细胞，新鲜和冷冻的组织，石蜡包埋组织，血液，体液，植物，真菌，细菌和病毒等任何样本中提取的) 中 m6A 直接定量检测甲基化状态是非常理想的。更多信息猛戳产品名称：[m6A RNA 甲基化定量检测试剂盒（比色法）](#)

最近，一些新颖的核苷酸修饰形式，首先在DNA中发现。比如：5-hmC, 5-fC, 5-caC。同时这些形式在人类和小鼠的组织中也被检测到。这些修饰的核苷酸一般是由5-mC氧化后得到的；通过TET家族酶反应得到。

在大规模转录组中RNA胞嘧啶甲基化状态有关的可信信息通过二代测序得到了很多有关RNA亚硫酸盐转化的信息。在二代测序中更好且高效的使用亚硫酸盐转化RNA文库制备。我们研发了第一款EpiNext RNA亚硫酸盐-测序试剂盒 (illumina) (A-P-9006)通过亚硫酸盐处理之后技术和更为深入的研究RNA甲基化分析知识，我们特别的优化了试剂配方，开发出了EpiNext RNA甲基化极易测序试剂盒 (illumina)。这个试剂盒具有以下优势和特点：

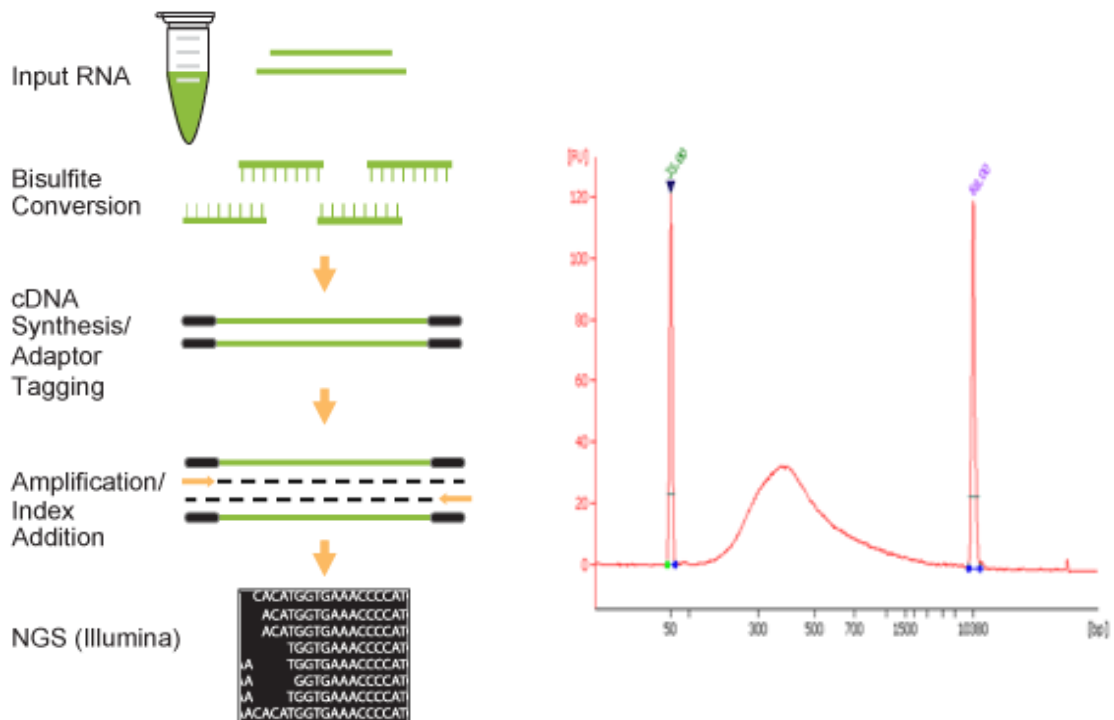
- 高敏感性和高效率：通过使用创新的方法让亚硫酸盐转化后的 RNA 成为完整且有标签的标志物成为可能。通过使用未标记的或半标记的 RNA 片段，非条码 (singleplexed) 和条码 (multiplexed) 文库制备可以高敏感且高效率，因此，提供了一种可行且稳定的工具来构建 5-mC RNA-测序文库。理想的 RNA 亚硫酸盐处理方法和加强型的可标记减少了片段化的损失和选择性偏差，这可以加强 RNA 输入量的降低至 5ng 且高效率完整的制备可标记的 cDNA 文库。
- 容易且优化的步骤：整个实验步骤需要在 6 个小时内完成。免凝胶的片段筛选和纯化节约了时间；减少了错误和有价值样本的损失。
- 完全转化：独创的试剂设计会以大于 99.9%的水平可将未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶，没有或微不足道的不恰当的甲基化胞嘧啶转化为胸腺嘧啶 (<0.1%)。可以表明使用的样本 RNA 的范围。
- 极其方便：这个试剂盒包括 RNA 文库制备过程每步所需试剂，对于亚硫酸盐转化，结扎，纯化，片段选择和文库扩增，因此，对于大多数亚硫酸盐处理 RNA 文库制备进行流水化作业是可信且始终如一的结果。
- 极小的偏差：超级高保真扩增可以用极小量的序列偏差和低错误比率增强了亚硫酸盐转化 RNA 文库的得率。
- 宽样本适用性：起始材料可以是各种组织/细胞样本比如：新鲜和冷冻的组织，培养细胞（来自培养瓶或微孔板）中提取的总体 RNA。
- 操作简便、可信、分析条件始终如一。

相关参考文献：

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

- **EpiNext RNA 甲基化极易测序试剂盒 (illumina)** 提供了对于 RNA 输入量的范围是：5ng-500ng。所有成功进行 RNA 亚硫酸盐转化和文库制备的必需的试剂。在这个制备试剂盒中，在转化过程中 RNA 被同时进行亚硫酸盐转化处理且片段化成恰当的长度。转化处理的 RNA，是以单链的形式存在，然后被转化成双链的 cDNA 和标记的形式。可标记的片段是通过使用 MQ Binding Beads 来进行分选和纯化的，紧接着使用超高保真的 PCR 混合液，可以用极小量的起始材料和低错误比率精确的增强了亚硫酸盐转化 RNA 文库的得率和扩增效率。



图示：EpiNext RNA 甲基化极易测序试剂盒 (illumina)

示例：文库片段的大小分布：使用 EpiNext RNA 甲基化极易测序试剂盒 (illumina) 从小鼠 RNA 样本量 50ng 进行亚硫酸盐后 cDNA 文库制备。

用法

操作手册

为了得到最好的实验结果，在实验开始前，请仔细地通读这个操作手册。

起始材料:

RNA输入量: RNA每次反应量范围在5 ng-500 ng。最佳输入量我们推荐每个反应使用100ng-200 ng的RNA。这样的输入量可以得到最佳的实验结果。可以使用DNase I来消除DNA的干扰。洗脱RNA时应该采用无DNA酶和RNA酶的水即Rnase-free water。你可以使用自己的办法来提取RNA。当然，本手册后附有RNA提取的相关产品。或加技术QQ: 1951545998咨询。

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. 工作溶液的制备:

a. 制备转化溶液:

添加1.4ml的转化溶液（**Conversion Buffer**）和40ul 脱硫溶液（**Desulphonation Solution**）到一瓶转化粉末（**Conversion Powder**）中形成转化溶液。通过反复涡旋和震荡瓶子持续3-4分钟（痕量未溶液的转化粉末任然保留是正常的，正如转化粉末在溶液中过饱和）。

b.添加 3ml 的蒸馏水到 7ml 100% 的乙醇中制备 70% 乙醇。

c.添加 1ml 的蒸馏水到 9ml 100% 的乙醇中制备 90% 乙醇。

d.制备脱硫工作液:

首先，以1: 12比例通过添加5ul 的**Desulphonation Solution** 到55ul 的蒸馏水中稀释**Desulphonation Solution**。其次，每1ml 的90% 乙醇添加2ul 的稀释的**Desulphonation Solution** 并混合。

2. RNA亚硫酸盐转化

a. 添加100ul的转化溶液（conversion solution）到一个PCR管子中，紧接着添加2-10ul 的RNA样本。

注: 准备好的转化溶液应该在-20°C 最多2周之内效率不会损失。最好的结果是，混合后的溶液应该是立即使用。

b. 盖紧PCR管子的盖子并且将它们放置在带盖子的热循环仪上。设置程序并运行热循环仪:

65 °C 5分钟

60 °C 90分钟

4°C 持续可达16h

同时，根据你的实验需要将**F-离心柱**插入到**F-收集管**中。

3. 转化后RNA纯化

- a. 添加250ul 的**NA Binding Solution** 到每个柱子中。然后，从每个PCR管子（从第2b步骤）转移样本到每个包含**NA Binding Solution**的柱子中。以12,000rpm离心1分钟。从收集管中拿出离心柱并将滤出液丢弃。再次将离心柱放回收集管中。
- b. 添加200ul 70%的乙醇溶液到每个柱子中。然后以12,000rpm离心1分钟。
- c. 添加200ul 的脱硫工作液（稀释的**Desulphonation Solution**和从第1d步骤90%的乙醇混合）每个柱子中。容许柱子室温静置30分钟，然后以12,000rpm离心1分钟。从收集管中拿出离心柱并将滤出液丢弃。再次将离心柱放回收集管中。
- d. 添加200ul 的90%的乙醇溶液到每个柱子中。以12,000rpm离心1分钟。从收集管中拿出离心柱并将滤出液丢弃。再次将离心柱放回收集管中。再次添加200ul 的90%的乙醇溶液到每个柱子中。以12,000rpm离心1分钟。
- e. 将每个柱子插入到一个新的1.5ml管子中。添加12ul的洗脱溶液（**Elution Buffer**）直接到柱基质上。以12,000rpm离心1分钟来洗脱转化后的RNA。

现在转化后的RNA已经准备好使用，或储存-20°C可达2个月。为了验证转化的效率，在cDNA合成后我们推荐使用我们的阳性对照引物（A-P-9003-50-F和A-P-9003-50-R）进行RT-PCR实验。

4. cDNA合成

- a. 根据表格1来准备cDNA合成反应，在一个0.2ml PCR管子中：

表1: cDNA转化

组件	体积
转化后的RNA*	10 ul (50-100ngRNA输入量)
5X Reaction Buffer	3.5ul
Adaptor-A (10 μM)	2 ul
Conversion Enzyme Mix	2 ul
Total Volume	17.5 ul

注：*如果转化后RNA体积不到10ul，添加蒸馏水使得总体积达到10ul。

混合并且放置在无盖的（确保盖子的温度是25°C）热循环仪在37°C孵育60分钟。

- b. 添加1.8ul的**RNA Digestion Buffer** 和 1ul 的**RNA Digestion Enzyme**到每个反应中，通过移液器来混合并在37°C孵育10分钟。

5. cDNA纯化

- a. 通过涡旋仪重新重悬**MQ Binding Buffer**。

b. 添加24ul 的重悬的磁珠到cDNA合成反应的PCR管子中。在涡旋混合器上充分的混合或是通过移液器上下吹打至少10多次来混合。

c. 室温孵育6分钟容许cDNA结合磁珠。

d. 将PCR管子放在恰当的磁力架上直至溶液澄清（大约是4分钟）。小心的移走并丢弃掉上清液。（注意：小心不要干扰或丢弃含有cDNA的磁珠）

e. 保持PCR管子放置在磁力架上并且添加160ul新鲜制备的90%的乙醇到管子中。室温孵育1分钟，然后小心的移走并丢弃乙醇。

f. 重复第5e步骤一次，总共是：2次清洗。

g. 打开PCR管的盖子并且用1-2分钟来风干磁珠同时管子一直在磁力架上。

h. 在11ul **Elution Buffer**中重新重悬磁珠并且室温孵育6分钟直到从磁珠上来充分释放cDNA。

i. 通过放置管子在磁力架上2分钟来获得磁珠或直至溶液完全澄清。

j. 转移11ul 到一个新的0.2ml PCR管子中。

6. 文库合成

a. 根据表2制备文库合成反应液，在一个0.2ml 的PCR管子中。

表2：文库合成

组件	体积
cDNA(从第5步)	10 ul
5X Reaction Buffer	3.5ul
Adaptor-B (10 μM)	2 ul
Total Volume	15.5 ul

b. 混合并且放置于无盖的（确保盖子的温度是25°C）热循环仪在98°C孵育2分钟。紧接着在冰上孵育2分钟。添加2ul 的Conversion Enzyme Mix 然后在无盖的热循环仪上37°C孵育60分钟。

7. 合成文库的纯化

a. 通过涡旋仪重新重悬MQ Binding Buffer。

b. 添加21ul 的重悬的磁珠到cDNA合成反应的PCR管子中。在涡旋混合器上充分的混合或是通过移液器上下吹打至少10多次来混合。

c. 室温孵育6分钟容许cDNA结合磁珠。

d. 将PCR管子放在恰当的磁力架上直至溶液澄清（大约是2分钟）。小心的移走并丢弃掉上清液。**注意**：小心不要干扰或丢弃含有cDNA的磁珠。

e. 保持PCR管子放置在磁力架上并且添加160ul新鲜制备的90%的乙醇到管子中。室温孵育1分钟，然后小心的移走并丢弃乙醇。

f. 重复第7e步骤一次，总共是：2次清洗。

g. 打开PCR管的盖子并且用1-2分钟来风干磁珠同时管子一直在磁力架上。

h. 在11ul **Elution Buffer**中重新重悬磁珠并且室温孵育2分钟直到从磁珠上来充分释放cDNA。

i. 通过放置管子在磁力架上2分钟来获得磁珠或直至溶液完全澄清。

j. 转移10.5ul 到一个新的0.2ml PCR管子中直至文库扩增和指数时使用。

注：合成的文库可以使用荧光的方法比如：Picogreen或实时荧光定量qPCR来定量。文库浓度的需要取决于文库的扩增循环数。

8. 文库扩增

a. 准备PCR反应

解冻所有反应的组件包括混合液，DNA/Rnase free water，引物溶液，和文库模板。短暂地通过涡旋仪混合。当使用时，保证组件在冰上操作，并且立刻紧接着是-20°C放回待用。根据下面的表格，添加组件到每个PCR管子/孔中。

组件	体积
HiFi Master Mix (2X)	12.5 ul
Primer U	1 ul
Primer I	1 ul
cDNA Library	10.5 ul
Total Volume	25 ul

注：使用试剂盒中包括的引物 I 制备单链的文库。对于多重的文库制备，使用货号：**A-P-1060-EpiNext NGS文库条码套装 -12** 12种不同的指数（引物）中的一个来代替引物 I。您也可以使用自定义的条码（与illumina兼容的）而非引物 I。

b.设置PCR反应的程序

放置反应板到仪器上并且按照下表设置PCR反应的条件：

Cycle Step	Temp	Time	Cycle
Activation	98°C	30 sec	1
Cycling	98°C	10 sec	Variable*
	55°C	20 sec	
	72°C	20 sec	
Final Extension	72°C	2 min	1

*PCR循环数可能需要优化，主要取决于RNA的输入量或cDNA文库合成的浓度。总之，对于200ng PCR循环数是12个，对于100ng PCR循环数是13个，对于50ng PCR循环数是14个和对于5ng RNA的输入量是19循环数。更为深入最佳的PCR循环数是要根据实际情况来设置的。

9.cDNA文库扩增后的纯化

a. 通过涡旋仪重新重悬MQ Binding Buffer。

b. 添加22.5ul 的重悬的磁珠到扩增反应的PCR管子中。在涡旋混合器上充分的混合或是通过移液器上下吹打至少10多次来混合。

c. 室温孵育6分钟容许cDNA结合磁珠。

d. 将PCR管子放在恰当的磁力架上直至溶液澄清（大约是4分钟）。小心的移走并丢掉上清液。**注意**：小心不要干扰或丢弃含有cDNA的磁珠。

e. 保持PCR管子放置在磁力架上并且添加160ul新鲜制备的90%的乙醇到管子中。室温孵育1-2分钟，然后小心的移走并丢弃乙醇。

f. 重复第9e步骤一次，总共是：2次清洗。

g. 打开PCR管的盖子并且用1-2分钟来风干磁珠同时管子一直在磁力架上。

h. 在12.5ul Elution Buffer中重新重悬磁珠并且室温孵育6分钟直到从磁珠上来充分释放DNA。

i. 通过放置管子在磁力架上2分钟来获得磁珠或直至溶液完全澄清。

j. 转移12ul 到一个新的0.2ml PCR管子中。

注：1) 对于文库制备的质量评估需要使用Agilent 的生物分析仪或是恰当的方法。文库的片段应该有正确的大小分布（ex:250bps达到峰值大小）没有适配的或二聚体的适配器（大概在127bps）。2) 为了确认大小分布，如有必要，用水来稀释文库并且将它涂抹到Agilent

的高敏感芯片上。如存在<150bps的适配器二聚体，我们建议您使用**0.8X MQ Binding Beads** 来移走小于150bps的片段。3) 有索引的文库数量定量可以采用qPCR, Qubit或Picogreen分析。4) 每种被编入索引的文库可以采用同等数量的多种文库来进行测序。

制备好的cDNA文库可以储存在-20°C直至测序时再使用。

疑难解答

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
RNA 修饰不完全	RNA 质量欠佳(RNA 严重降解)	检查 RNA 样本 260/280 比率是在 1.9-2.0。
	太小的 RNA 或太多的 RNA (比如: <1ng 或>1ug)	在合适正确的范围内, 增加或减少 RNA 输入量, 最佳的输入量是: 100ng-200ng。
	温度或热循环条件不正确	检查恰当的温度或热循环条件。
	不足的 RNA 纯化	确保在第 1d 步骤中每 1ml 的 90% 乙醇 添加 2ul 稀释的 Desulphonation Solution 。
	试剂盒没有恰当的保存或不当处理	根据这个操作手册中的储存温度保存试剂盒的各个组分。
洗脱液包含少量或没有 RNA	输入的 RNA 质量欠佳 (降解)	检查 RNA 是否降解。
	NA Binding Solution 没有被加入到样本中	确保 NA Binding Solution 是按照第 3a 步骤添加的。。
	被用作 RNA 纯化的乙醇溶液的浓度是不正确的	对于 RNA 纯化需要使用 90%乙醇。
文库低得率	不足数量的起始 RNA	为了得到更好的结果, 输入的 RNA 量应该是: >5ng。
	在每个反应步骤中不恰当的反应条件	确保试剂是恰当的被添加和孵育温度和时间是正确的, 在每次反应步骤, 包括消平, 适配器结扎, 片段分选和文库扩增。
	储存试剂盒不恰当	确保试剂没有超过最后日期。标准的保存期限, 在恰当的储存温度, 从收到货之日起算, 至少 6 个月。
在 Agilent 生物分析仪之外的痕量片段大小: <150bp 的适配器二聚体或比期望的片段更大	在片段筛选中针对 cDNA 的体积所对应的 MQ Binding Beads 的比率是否恰当	检查 MQ Binding Beads 的体积是正确的添加到 cDNA 溶液中。采用适当的比率来移除不希望的峰值片段。
	不足的标记	太多或太少的 cDNA 输入可能引起的不足标记, 这样可以转移群体的峰值片段大小, 更短或比期望的更大。确保输入恰当的 cDNA 数量保证标记反应的进行 (在 cDNA 合成和文库合成步骤)。
	文库的过度扩增	来自文库的过度扩增引发的 PCR 人为加大引起的超预期种群的片段化。确保恰当的 PCR 循环数来解决这个问题。

订购信息

货号	品名	规格
A-P-9007	EpiNext RNA 甲基化极易测序试剂盒 (Illumina)	12 次、24 次
A-P-9009	总体 RNA 甲基化极易定量检测试剂盒(荧光法)-new	48 次、96 次
A-P-9005	m6A RNA 甲基化定量检测试剂盒(比色法)	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
A-P-9003	RNA 甲基化修饰试剂盒	50 次、100 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---无需提取 DNA	40 次、80 次
A-P-1026	DNA 甲基化极速修饰试剂盒---需要提取 DNA	50 次、100 次
A-P-1050	96 孔 DNA 甲基化极速修饰试剂盒 (磁珠法)	96 次、192 次
A-P-1054	DNA 甲基化极易修饰试剂盒	50 次、100 次
A-P-1064	游离环状 DNA 提取试剂盒 (磁珠法)	25 次、50 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-1030	DNA 甲基化极易定量检测试剂盒(比色法)	48 次、96 次
A-P-1032	DNA 羟甲基化极易定量检测试剂盒(比色法)	48 次、96 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-P-1060	EpiNext NGS 文库条码套装 -12	144 次
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；订购电话：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>

8. 【表观遗传-m6A 深度研究】绝招在身，走遍天下！掌握表观遗传学前沿产品研究工具！

<http://www.aderr.com/cn/main.php?m=1349&t=3606&id=49286>



公众号：AD-Bio



订阅号：Bio-888



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 米艾德园（102206）

电 话：010-52406250

传 真：010-52406250

网 址：www.aderr.com

Email:tech@aderr.com