



*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。

总体RNA甲基化极易定量检测试剂盒（荧光法）

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，进行总体水平的RNA甲基化定量分析，整个实验时间仅需2.4小时。主要检测仪器：荧光分光光度计。

目录号： A-P-9009（48次、96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0.6.1.5版



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



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，请通读这个操作手册。	9
凝难解答	12
附录.....	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-9009-48 (48次)	A-P-9009-96 (96次)	保存条件
WB (10XWash Buffer)	14 ml	28 ml	4° C
BS (Binding Solution)	5 ml	10 ml	常温
NC (Negative Control containing 0% 5-mC,50 ug/ml) *	50 ul	100 ul	-20° C
PC (Positive Control containing 2% 5-mC,50 ug/ml) *	10 ul	20 ul	-20° C
mCAb (5-mC Antibody,1000X) *	5 ul	10 ul	4° C
SI (Signal Indicator,1000X) *	5 ul	10 ul	-20° C
ES (Enhancer Solution) *	5 ul	10 ul	-20° C
FD (Fluoro Developer)	12 ul	24 ul	-20° C
FE (Fluoro Enhancer)	12 ul	24 ul	-20° C
DB (Dilution Buffer)	5 ml	10 ml	常温
8联管 (带封口膜)	6	12	4° C
使用手册	1	1	常温

*在使用之前将溶液离心至管底。

注：**NC**(阴性对照)是未甲基化的RNA，包含0%的5-甲基胞嘧啶(5-mC)。**PC**(阳性对照)是甲基化的RNA和含有2%的5-甲基胞嘧啶(5-mC)。

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**NC**、**PC**、**SI**、**ES**、**FD**和**FE** 在-20° C下避光保存；2) **WB**、**mcAb**和**8联管**在4° C避光保存；3) 剩余的组件（**BS**和**DB**）室温避光保存。

注意：在使用前检查Wash buffer,**WB**,是否包含盐的沉淀物。若是，室温或37° C加热并晃动溶液直至溶液再次溶解。

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)

- 带盖的热循环仪
- 可读取530 nm和590nm处的微孔板读取仪（荧光分光光度计）
- 带有37° C的孵化器
- 8通道调移液器
- 1.5 ml 离心管(需要灭菌处理)
- 带滤芯吸头(需要灭菌处理)
- 封口膜或封板条
- 1X TE buffer, pH7.5-8.0
- 感兴趣已经提取好的RNA（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: 总体RNA甲基化极易定量检测试剂盒(荧光法)) 专门为定量检测总RNA中 RNA甲基化水平而设计的。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, 但不仅限于此, 培养细胞、新鲜和冷冻的组织、血浆/血清样本和体液等样本。

RNA输入量: 对于每次实验RNA的输入量是50-300 ng.最为理想的RNA的输入量应该是200 ng, 正如我们所知, 在某些种属中RNA中的5-mC通常不到总RNA的0.1%。

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, 血浆/血清样本, 体液样本等等。

内控: 这个试剂盒中包括了阳性RNA对照和阴性RNA对照。使用0.05%到2% 的RNA对照绘制标准曲线。因为不同的组织之间RNA中5-mC的含量不一样; 正常的和病变的部分也不一样; 或处理和不处理的条件。因此, 我们建议使用二份样本来做, 这样可以保证生成信号的可信性。这个试剂盒容许实验人员对于RNA进行定量并且最好是取二份不同提取的RNA样本对于RNA进行相对定量分析。

预防措施:

为了避免交叉污染, 小心的吸取样本或将溶液添加到微孔板中。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。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:

每批总体RNA甲基化极易定量检测试剂盒（荧光法）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:

总体RNA甲基化极易定量检测试剂盒（荧光法）是为研究用途,不适合诊断或治疗的应用。

知识产权:

总体RNA甲基化极易定量检测试剂盒（荧光法）中使用的原理和方法,我司有产品使用的追索权。

产品简介

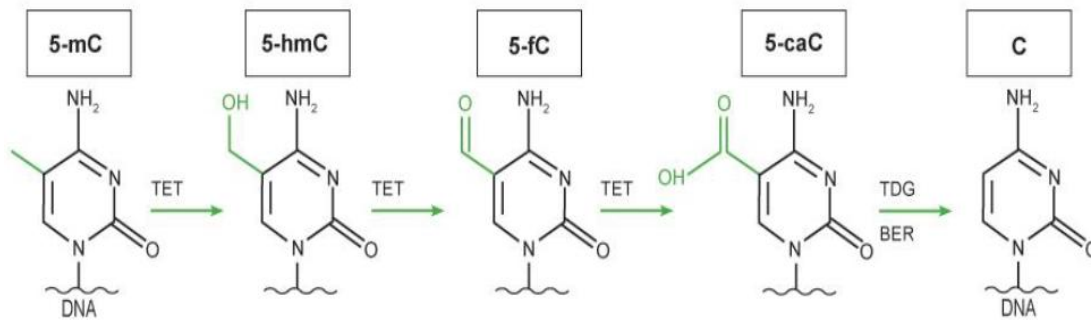
在 DNA 中 5-甲基胞嘧啶通过 DNA 甲基转移酶甲基组的同价原理发生在胞嘧啶环的第五位碳原子上。这个过程很好地被研究并且通常伴随有基因的表达和抑制。尤其是在人类中观测到, 5-甲基胞嘧啶发生在各种形式的 RNA 分子中, 包括 tRNAs, rRNAs, mRNAs 和非编码 RNAs (ncRNAs)。5-甲基胞嘧啶看起来都富集于 ncRNA 这类中, 但是相对的在 mRNAs 中是在减少。5-甲基胞嘧啶的水平在动物基因组中是不一样的, 水平量在一些昆虫中不被发觉的到在人类细胞中大概有 0.1-0.45% 的总 RNA 量。大多数 (83%) 的 5-甲基胞嘧啶是在 mRNAs 中发现的。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 Fe²⁺ 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现遗传标记的生物学, 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。



精确和方便的定量检测5-甲基胞嘧啶是极其的有用。在各种生理学上和病变中，识别和理解发生在RNA上的5-mC甲基化水平的变化是非常有意义的。目前仅有的基于色谱的技术比如：MS-LC对于检测RNA中总体的5-mC水平。然而，这种方法费时，通量低，需要的RNA量多和高成本。为了解决这些问题，我们联合国外知名的表观遗传学公司特别的开发了：总体RNA甲基化极易定量检测试剂盒（荧光法）。这款试剂盒有如下的优势和特点：

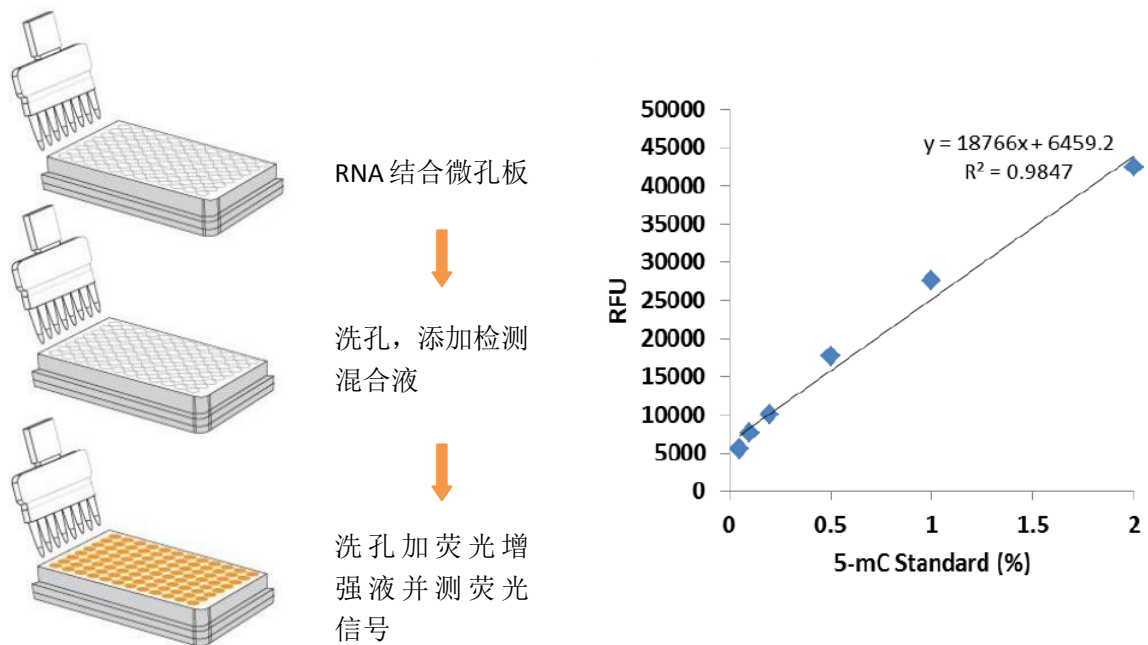
- 极速：整个操作步骤仅需 2 小时 40 分钟完成。基于一个样本 2 份分析测定。
- 稳定：这款试剂盒容许分析过程有更大的信号窗口，且复孔只有微小的变化。
- 方便：内在低背景噪音，可以消除孔板阻断的步骤。
- 高敏，检测的最低下限为 0.02% 的 5-mC RNA，RNA 输入量是：200ng 。
- 特异性：高特异性地结合 5-mC，在未甲基化的胞嘧啶或羟甲基化胞嘧啶不会产生交叉反应；针对不同的浓度范围的样本 RNA。
- 普遍性：阳性对照和阴性对照容许对任何物种的 RNA，检测 5-mC RNA。
- 精确性：最佳的阳性对照是可以按照一定的百分比，分成几部分，然后绘制标准曲线，精确性更高。结果堪比 HPLC-MS 色谱分析。甚至更优。
- 灵活性：96 孔可拆卸板模式使研究人员能根据自己需要选择手工或是高通量模式分析。
- 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.

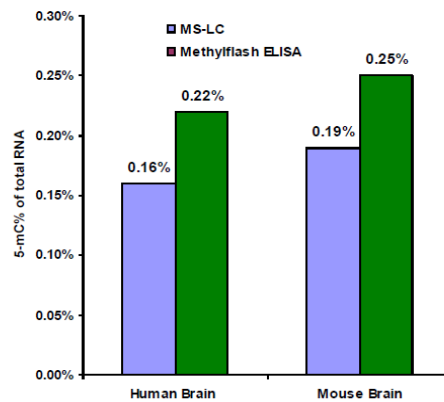
原理/步骤

总体RNA甲基化极易定量检测试剂盒（荧光法）提供了所有定量检测总RNA中5-mC试剂。在这个分析试剂盒中，RNA被高效的结合吸附在微孔板上。微孔板经过特殊的处理对于核酸具有较高的亲和力。使用捕获和检测抗体对于RNA中的5-mC进行检测并且通过荧光分光光度计可以定量的读取荧光信号。5-mC RNA的百分比与测量的荧光强度成正比。



图示：总体 RNA 甲基化极易定量检测试剂盒(荧光法)

示例：使用 5-mC 阳性对照绘制标准曲线。



使用总体 RNA 甲基化极易定量检测试剂盒(荧光法)精确定量来自不同种属的各种 RNA 样本。取得的结果与色谱分析法 MS-LC 相媲美。甚至更好。

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输入质量和数量：输入的RNA应该有较高的纯度，通常260/280比率>2.0；并且没有DNA干扰。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。RNA每次反应量范围在50 ng-300 ng。然而，最佳输入量我们推荐每次使用200 ng的RNA。这样的输入量可以得到最佳的实验结果。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：

稀释Wash Buffer：

针对48次试剂盒：添加13 ml 的 **WB**（10X Wash Buffer）到117 ml 的蒸馏水（最终pH7.2-7.5）中。制备稀释的**WB**（1X Wash Buffer）。

针对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。制备稀释的**WB**（1X Wash Buffer）。

这个**稀释的 WB** 1X Wash Buffer现在可以储存在4° C可达6个月。

FD溶液（Fluorescence Development Solution）：每500ul的DB(Dilution Buffer)添加1ul的FD(Fluoro Developer) 和1ul的FE(Fluoro Enhancer)。每个分析孔需要大概50ul的FD溶液。

试剂的大概体积量体现在如下的表格中：

Reagents	1 well	8 wells (1 strip)	16 wells (2 strips)	48 wells (6 strips)	96 wells (12 strips)
Diluted WB	2.5 ml	20 ml	40 ml	120 ml	240 ml
BS	100 µl	800 µl	1600 µl	4800 µl	9600 µl
5-mC Detection Complex	50 µl	400 µl	800 µl	2400 µl	4800 µl
Fluorescence Development Solution	50 µl	400 µl	800 µl	2400 µl	4800 µl
NC	N/A	2 µl	2 µl	4 µl	8 µl
PC	N/A	N/A	Optional	4 µl	8 µl

注：保证每种稀释液(除**稀释液 WB 1X Wash Buffer**外)在冰上操作，直至使用。任何剩余的稀释的溶液，除稀释的WB外，所有不在同一天稀释的溶液都应当丢弃。

2. 标准曲线的绘制:

使用7ul的NC稀释1ul的PC来制备稀释的PC。充分混合。然后，按照如下表格通过结合液PC，稀释液PC，和NC制备6个对照浓度点。

对照		PC(2.0%)		稀释的PC(0.25%)		NC
0.05%PC/孔	=	0.0 ul	+	1.0 ul	+	9.0 ul
0.1%PC/孔	=	0.0 ul	+	1.0 ul	+	4.0 ul
0.2%PC/孔	=	0.0 ul	+	2.0 ul	+	3.0 ul
0.5%PC/孔	=	1.0 ul	+	0.0 ul	+	7.0 ul
1.0%PC/孔	=	2.0 ul	+	0.0 ul	+	6.0 ul
2.0%PC/孔	=	3.0 ul	+	0.0 ul	+	3.0 ul

注: 以上的体积是足够的，对于绘制一个标准曲线。而且是一式两份。（总共是12个孔）

3. RNA结合:

针对如下48孔设置的标准曲线，了解对照和样本等所在的孔位（对于96孔板的设计，第7到12列均是样本孔）。对照和样本建议做个复孔，垂直加样而不是水平。

Well #	Strip 1	Strip 2	Strip 3	Strip 4	Strip 5	Strip 6
A	NC	0.5%PC	Sample 2	Sample 6	Sample 10	Sample 14
B	NC	0.5%PC	Sample 2	Sample 6	Sample 10	Sample 14
C	0.05%PC	1%PC	Sample 3	Sample 7	Sample 11	Sample 15
D	0.05%PC	1%PC	Sample 3	Sample 7	Sample 11	Sample 15
E	0.1%PC	2%PC	Sample 4	Sample 8	Sample 12	Sample 16
F	0.1%PC	2%PC	Sample 4	Sample 8	Sample 12	Sample 16
G	0.2%PC	Sample 1	Sample 5	Sample 9	Sample 13	Sample 17
H	0.2%PC	Sample 1	Sample 5	Sample 9	Sample 13	Sample 17

- 根据实验需要预先计算实验所需的8联管数量。小心的从板架上取下暂不需要的联管并将它放回袋子中（紧紧将袋口封上并储存在4° C）。
- 对于阴性对照孔：添加100ul的BS和2ul的NC。
- 对于阳性对照孔：在每个不同的浓度点位置（0.05%-2%）添加100ul的BS和2ul的NC，来绘制标准曲线（看下面的注解）。
- 对于样本孔：添加100ul的BS和200ng的样本RNA(2-8ul)。

注: 1) 为了减少复孔的交叉变化，根据如上微孔板各种样本的布局，和微孔板的结构特点，垂直加样这点是非常重要的。

- 对于阳性对照，使用不同浓度甲基化百分比（0.05%，0.1%，0.2%，0.5%，1%和2%），每孔建议的总RNA量是：200ng。阳性对照应该与样本在同一个板子中平行进行。并且对于每次分析实验时，应该绘制新的标准曲线。

- 3) 为了最佳的结合效果，尽可能减少移液器吸取液体量的误差，样本RNA添加的体积应该是2ul或更多，但是最大不要超过5ul。如果样本RNA是每孔不到200ng，阳性对照RNA的量应该根据样本RNA的数量调成相等的。这样可以确保精确定量5-mC。
- 4) 确保 **NC**，**PC**，和样本RNA完全添加到孔中，将吸头放在 **BS** 孔溶液中并啐打1-2次。当添加样本增加样本体积时，应该精确的添加到每个孔中，同时，要更换枪头。
- e. 轻柔的从一边到另一边混合溶液或轻轻摇晃板子几次。确保溶液均匀地覆盖住每个孔底。使用板盖子或封口膜封好板子并在37° C孵育90分钟。
- f. 样本孵育到最后一个10分钟时，准备5-mC检测混合液：在每1ml的稀释WB中添加1ul的**mcAb**，混合并且添加1ul的**SI**和1ul的**ES**。充分混合。
- g. 在60分钟孵育之后，从每孔上移走 **BS**（结合液）。每次使用 150 ul 稀释的 **WB** 清洗每孔三遍。可以用枪头吸取WB溶液来简单的清洗。

4. 5-mC RNA检测和信号测量:

- a. 添加 50 ul 的**5-mC检测混合液**到每孔中，然后覆盖并在室温下孵育 50 分钟。
- b. 使用移液器从每孔中移走**5-mC检测混合液**。
- c. 每次使用 150 ul 的**稀释的 WB** 清洗每孔5次。

5. 信号检测:

- a. 添加 50 ul 的 **FD(Fluorescence Development Solution)** 到每孔中并室温避光孵育 2-4 分钟。开始监测样本孔和阳性对照孔的颜色变化。当**Fluorescence Development Solution**开始变成粉色时。
- b. 在2-10分钟，波长530ex/590em nm处使用荧光分光光度计读取荧光信号。

注: 1). 荧光信号时间可以在1-10分钟间观测。要兼顾颜色变化的速度。但是有代表性的时间是：3-4分钟。

2). 如果联管板架不适合微孔板读取仪，可以将溶液转移到一个新的96微孔板中来测。

6. 计算5-mC%

计算5-mC RNA的百分比：第一，绘制标准曲线并且绘制RFU值与PC在每个浓度点的百分比。第二，使用线性回归（微软的Excel表）确定标准曲线的斜率（RFU/1%）和标准曲线最相关部分的斜率（至少四个浓度点，包括0浓度点）。最后，使用如下的公式计算甲基化的RNA即5-mC在总RNA的百分比：

$$5\text{-mC}\% = \frac{\text{Sample RFU} - \text{NC RFU}}{\text{Slope} \times S} \times 100\%$$

S 是以 ng为单位 样本RNA输入量。

计算举例：

NC RFU 均值是1250

样本 RFU 均值是11250

Slope 是25000/1%

S 是 200 ng

$$5\text{-mC}\% = \frac{11250 - 1250}{25000 \times 200} \times 100\% = 0.2\%$$

注：1) .计算出的5-mC%=5-mC/总RNA(A+G+C+U)。如果5-mC%是扮演5-mC/(5-mC+C)角色，简单的除以计算的5-mC%通过报道的已经得到的物种的胞嘧啶含量。2).如果标准曲线是平的，有可能是因为最低的%PC是平的；或是平的有可能是因为高RFUs是平的，信号强度饱和所导致发光时间延迟；5-mC%可以使用对数或微积分中的二项式来计算得出，单独列出（见附录）。

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。
	不正确的读取荧光信号	检查荧光分光光度计是否采用恰当的波长 (530ex/590em nm) 读取。
	试剂盒被不恰当的储存或不当的处理	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。
仅 PC (阳性对照) 孔中无信号或微弱信号	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)。
	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。
在阴性对照孔中存在高背景	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。
	过度荧光信号	在第 5a 步中减少第 5a 步中的荧光时间。
在复孔之间有较大的变化	推迟的加入试剂和水平加样导致不一致	遵循在第 3 步示例的垂直加样。确保加入的试剂同样是垂直加入的。建议采用多通道移液器, 尤其是第 5a 步中添加 FD (Fluorescence Development Solution)。
	剩余的清洗液残留在某些孔中	在每次清洗步骤, 确保清洗液完全被移走。
	溶液或抗体没有被实际的添加到孔中	不容许移液器吸头触碰到孔的内侧和外侧边缘; 同时预防溶液粘在表面。
	没有用同样的移液器贯穿实验始终	使用多通道移液器贯穿实验始终, 因为不同的移液器可能在实验过程中, 有差别。
	在孔中喷洒试剂	小心的加液到孔中, 避免喷洒试剂。
	温度变化透过孔板	在孵育的步骤, 确保孔板以稳定的和完全的温度环境覆盖, 避免草率。
仅在样本复孔有较大变化	样本 RNA 有沉淀物或在加入到孔前浓度不均匀	充分的混合你的 RNA 样本并均匀的垂直添加到孔中。
mcAb(5-mC 抗体) 瓶子出现空的或体积不够	溶液蒸发导致体积变少, 导致更高浓度的抗体	添加 1X PBS 溶液到 mcAb(5-mC 抗体) 瓶子中, 直至恰当的恢复到试剂盒中组件正常的包装量。在使用之前混合并离心。

附录

方法一：使用二项式中的对数来计算得出5-mC%

当标准曲线是平的，由于起始的最低的%PC所致的高RFUs，使用这个方法。

- Plot the average RFU value on the Y-axis versus the known 5-mC percentage of each PC point on the X-axis.
- Graph the second order logarithmic curve* (also see “Example Calculation” below) and obtain second order logarithmic regression equation:

$$Y = a \ln(X) + b$$

Here, $X = 5\text{-mC}\%$; $Y = \text{Sample RFU}$; a is Slope and b is Y-intercept, respectively.

* Microsoft Excel's logarithmic regression function can be used for easy and convenient calculation of 5-mC%.

- Calculate 5-mC% of the samples based on the following equation, derived from the above equation

$$5\text{-mC}\% = e^{[(Y-b)/a]} \div S \times 100\%$$

Here, S is the amount of input sample RNA in ng.

方法二：使用二项式中的多项式来计算得出5-mC%

当标准曲线是平的，由于高的%PCs所致的饱和信号强度，使用这个方法。

- Plot the average RFU values on the Y-axis versus the known 5-mC percentage of each PC point on the X-axis.
- Graph the second order polynomial curve* (also see “Example Calculation” below) and obtain second order polynomial regression equation:

$$Y = aX^2 + bX$$

Here, $X = 5\text{-mC}\%$; $Y = \text{Sample RFU} - \text{NC RFU}$; a and b is known Slope 1 and Slope 2, respectively.

* Microsoft Excel's polynomial regression function can be used for easy and convenient calculation of 5-mC%.

- Calculate 5-mC% of the samples based on the following equation, derived from the above equation.

$$5\text{-mC}\% = \frac{(b^2 + 4aY)^{0.5} - b}{2a} \div S \times 100\%$$

Here, S is the amount of input sample RNA in ng.



订购信息

货号	品名	规格
A-P-9009	总体 RNA 甲基化极易定量检测试剂盒(荧光法)	48 次、96 次
A-P-9007	EpiNext RNA 甲基化极易测序试剂盒 (Illumina)	12 次、24 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-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