*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。

# m$^{6}$A 去甲基化酶活性/抑制分析试剂盒（比色法）

此品非常适合广泛的物种比如从哺乳类动物，植物，真菌和细菌，不仅如此，还包括培养细胞与新鲜和冷冻的组织等样本中提取核蛋白或纯化的 m6A 脱甲基酶如：从各种物种样本中得到的FTO和ALKBH5，进行 m$^{6}$A 去甲基化定量分析，整个实验时间仅需5小时。

**目录号： A-P-9013（48次、96次）**

## *操作手册*

**在您收到定购的产品时，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**

2017年9月，第1版，对应英文第20170717版

扫我收藏分享，还有机会拿红包哦！

**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......4
一般特性......3
产品简介......4
原理/步骤......8
用法......3
操作手册 ......13
附录......11
表 1 和 2......11
表 3......14
疑难解答......14
定购信息......14
推荐产品......14
如何下单 ......15
推荐阅读 ......114

# 试剂盒组成

| 内容 | A-P-9013-48 (48次) | A-P-9013-96 （96次） | 保存条件 |
|---|---|---|---|
| **WB** (10XWash Buffer) | **14 ml** | **28 ml** | 4° C |
| **DB** (Demethylase Buffer) | **3 ml** | **6 ml** | 常温 |
| **MS** (10X m$^6$A 底物)* | **10 ul** | **20 ul** | –20° C |
| **BS** (Binding Solution) | **5 ml** | **10 ml** | 常温 |
| **AS** (Assay Standard,2 ug/ml) * | **10 ul** | **20 ul** | –20° C |
| **CA** (Capture Antibody,1000X) * | **5 ul** | **10 ul** | 4° C |
| **DA** (Detection Antibody,1000X) * | **6 ul** | **12 ul** | –20° C |
| **ES** (Enhancer Solution) * | **5 ul** | **10 ul** | –20° C |
| **DS** (Developer Solution) | **5 ml** | **10 ml** | 4° C |
| **SS** (Stop Solution) | **5 ml** | **10 ml** | 常温 |
| **Co-Factor 1*** | **30 ul** | **60 ul** | –20° C |
| **Co-Factor 2*** | **30 ul** | **60 ul** | –20° C |
| **Co-Factor 3*** | **30 ul** | **60 ul** | –20° C |
| **8联管**(带框架) | **6** | **12** | 4° C |
| 使用手册 | **1** | **1** | 常温 |

*在开盖使用之前，为了最大程度的利用产品，需将溶液离心至管底。

# 运输和保存

该试剂盒分三部分运输，第一部分是在室温环境下；第二和第三部分需在4° C加冰袋运输。

当您收到产品后：1）需将**MS**、**AS**、**DA**、**ES**、**Co-Factor 1**、**Co-Factor 2**和**Co-Factor 3**在–20° C下避光保存；2）**WB**、**CA**、**DS**和**8联管**在4° C避光保存；3）剩余的组件（**DB**、**BS**和**SS**）室温避光保存。

注意：在使用前检查**WB**（10X Wash buffer）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12个月，自购买之日算起。

# 配套器材(自备)

③ 可读取450 nm处的酶标仪或微孔板读取仪
③ 带有37° C的孵化器
③ 可调移液器或多通道移液器
③ 多通道移液槽
③ 1.5 ml 离心管(需要灭菌处理)
③ 带滤芯吸头(需要灭菌处理)
③ 封口膜或封板条
③ 核蛋白或纯化的酶
③ 蒸馏水

# 重点提示

**使用必读：**

**使用：**$m^6A$ 去甲基化酶活性/抑制分析试剂盒（比色法） 专门为定量检测总RNA中$m^6A$ RNA脱甲基酶水平而设计的。其中使用核蛋白或纯化的 m6A脱甲基酶比如：FTO 和 ALKBH5 可以来自广泛的种属比如：哺乳动物，植物，真菌和细菌，其他各种形式如：培养细胞，新鲜和冷冻的组织，但远不仅限于这些样本。

**起始材料：**输入材料可以是核蛋白或纯化的酶。

**输入量：**每次分析的核蛋白量范围是：2ug - 20ug ，且最佳的范围是：5ug - 10ug 。纯化的 m6A DNA脱甲基酶的量范围是：20ng- 1ug ，且最佳的范围是：50ng- 500ng ，取决于纯化或者是酶的催化还原活性。

**内控：**这个试剂盒中包括了分析的标准品来定量检测 m6A 脱甲基酶的活性。因为m6A脱甲基酶活性在不同的组织，以及从正常的和病情的状态是不一样的。为此，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。

**预防措施:**

为了避免交叉污染，仔细的吸取样本或溶液到条孔中。使用防止气溶胶的带滤芯的枪头并在不同溶液的转移中更换枪头。操作全程需要带手套。为了防止手套与样本之间的污染，需要立刻更换手套。

# 说明

## 一般特性

**质控:**

每批$m^6A$ 去甲基化酶活性/抑制分析试剂盒（比色法）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：**

$m^6A$ 去甲基化酶活性/抑制分析试剂盒（比色法）是为研究用途,不适合诊断或治疗的应用。

**知识产权：**

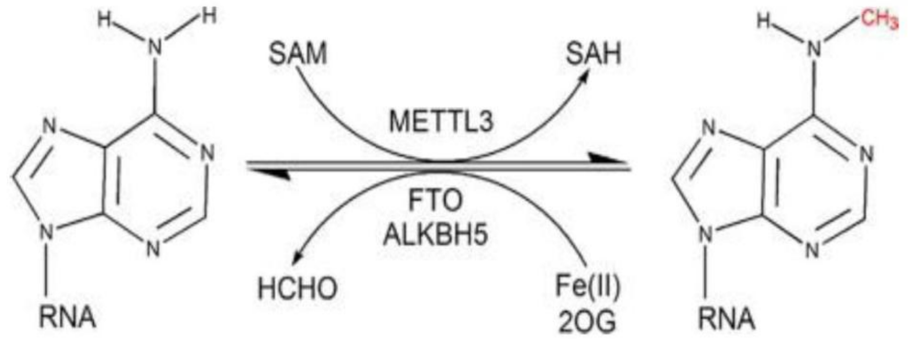
$m^6A$ 去甲基化酶活性/抑制分析试剂盒（比色法）中使用的原理和方法,我司有产品使用的追索权。

# 产品简介

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。最近，DNA m6A 同样在真核生物的很多细胞系中被鉴定比如：线虫和果蝇，此外在更高的物种如：植物，小鼠和人类的细胞中也存在。m6A 在 DNA 的复制，DNA 损伤，RNA 连接，转座，转录和细胞的防御。在人类细胞中，

m6A 修饰是由 m6A 催化甲基转移酶复杂 METTL3/METTL14 和最近发的 m6A RNA 去甲基转移酶如 FTO 和 ALKBH5，这种 m6A 的修饰去甲基是以 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， FTO 和 ALKBH5 和类似于 TET 酶扮演着重要角色。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，m6A 在很多癌症中大量的存在于 DNA 的修饰中。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。除此之外，在癌细胞的规格，相对于初级的细胞/组织包含有相当低的 DNA m6A （<0.001%），我们发现在人类体外细胞（0.03%-0.22%）中 m6A 修饰的增长以数百倍的速度增加。

在癌症中m6A的减少常常伴随有m6A的去甲基化酶。我们观测到FTO在急性骨髓性白血病（AM）中存在高表达并且在急性髓细胞白血病（AML）中导致肿瘤的重要角色。因此，确定这种酶的活性对于癌症的诊断和癌症的治疗提供新的靶向提供依据。然而，使用核蛋白和纯化的酶来检测m6A 去甲基化酶活性的工具极少。为了解决这个难题，我们团队再次发力，开发并且提供了 m6A 去甲基化酶活性/抑制分析试剂盒（比色法）。




在DNA/RNA中$m^6A$甲基化是可逆的（文献1）

**$m^6A$ 去甲基化酶活性/抑制分析试剂盒（比色法）** 具有以下优势和特点：

③ 类似于 Elisa 步骤的比色法检测方便快学。整个操作步骤可在 5 小时完成。

③ 独创的试剂盒成分使得背景信号极其低并且容许分析更为简单，精确，可信和一致性。

③ 细胞/组织核蛋白和纯化的蛋白均可使用，容许在体内或体外来检测 m6A 去甲基化酶抑制剂的抑制作用。

③ 新颖的分析原理容许高敏来完成。活性检测最低下限为 2 ug 的 核蛋白或 50 ng 的纯化酶。

③ 包括的标准对照，对于来自任何种属的 m$^6$A 去甲基化酶活性都可以实现定量检测。

③ 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。

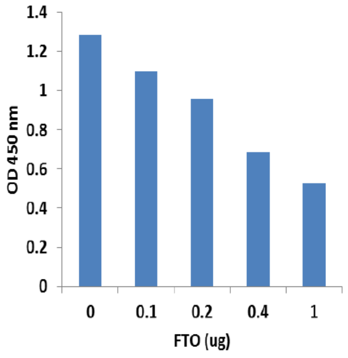
③ 操作简便、可信、分析条件始终如一。

**相关参考文献：**

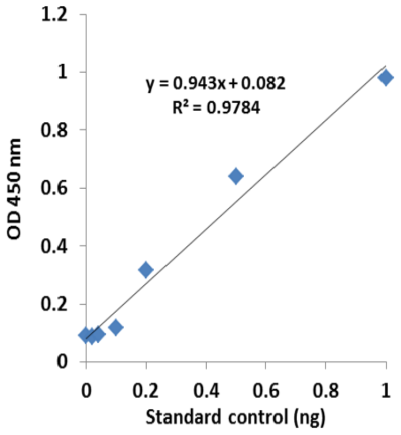
1. Niu Y et al: Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 11:2013.
2. Cantara WA, et al. NucleicAcids Res. 2011; 39: D195-201.
3. Motorin Y, Helm M.Nucleic Acids Res. 2010;38(5): 1415-1430.
4. Squires JE, Preiss T.Epigenomics. 2010; 2(5):709-715.
5. Chow CS, et al. ACSChem Biol. 2007; 2(9): 610-619.
6. 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

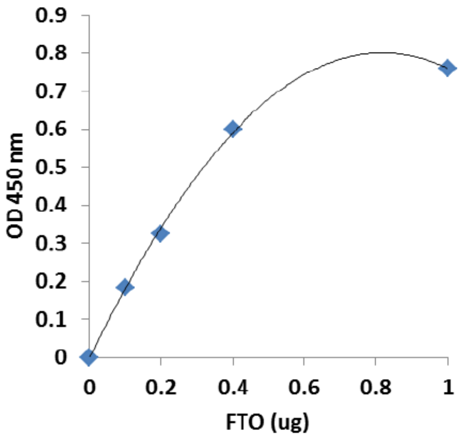
**m$^6$A 去甲基化酶活性/抑制分析试剂盒（比色法）**是专门为检测总体的m6A 去甲基化酶活性/抑制而设计的。在这个分析试剂盒中，独特且唯一的 m$^6$A 底物被紧紧的包被在条孔上。有效的m6A 去甲基化酶结合且去甲基化酶 m6A 包含在底物中。底物中未去甲基化的m6A 使用高亲和力的m6A 抗体来识别并且使用增强溶液来加强免疫信号。未去甲基化的m6A的比率或数量，与酶的活性成反比例，可通过一种类似-ELISA的反应来比色定量检测。




图示 1：使用 m$^6$A 去甲基化酶活性/抑制分析试剂盒(比色法)对重组蛋白 FTO 完成的 m6A 去甲基化酶活性。重组的人 FTO 酶以不同的浓度点加入。原始的 OD 数据。OD 与 FTO 酶活性成反比例。




图示 2：使用 m6A 去甲基化分析标准品来绘制如上的标准曲线。




图示 3：从图示 1 经过转换得到 OD 值的数据。

# 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：

输入量：每次分析的核蛋白量范围是：2ug - 20ug ，且最佳的范围是：5ug - 10ug 。纯化的 m6A DNA脱甲基酶的量范围是：20ng- 1ug ，且最佳的范围是：50ng- 500ng ，取决于纯化或者是酶的催化还原活性。

核蛋白提取：你可以使用自己的办法来提取核蛋白。当然，我们也提供配套的核蛋白提取试剂盒（货号：OP-0002，具体可加微信号：hugasis咨询），与此试剂盒配合使用可以得到理想的实验结果。

核蛋白或纯化酶的储存：核蛋白或纯化酶应该储存在 - 80° C直到使用为止。

**1.** 溶液和试剂制备：

a.制备**稀释的WB** (1X Wash Buffer)：

48次试剂盒：添加13 ml 的 **WB**（10X Wash Buffer） 到117 ml 的蒸馏水中调整pH值在7.2-7.5。

96次试剂盒：添加26 ml 的 **WB**（10X Wash Buffer） 到234 ml 的蒸馏水中调整pH值在7.2-7.5。

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

b.制备 **最终的 DB**：

以1:100（如：添加每种**Co-Factor** 1ul 到 DB中，总的是：103ul）添加 **Co-Factor 1**，**C o-Factor 2**，和**Co-Factor 3**到 DB（Demethylase Buffer）中。每个分析孔中大概需要添加 50ul 的最终DB。

c. 制备 **1X MS** 底物：

添加 1ul 的**MS**（10X m6A Substrate）到 9ul 的 DB中。每个分析孔中大概需要添加2ul 的**1X MS**。

d. 制备**稀释的 CA**：

使用**稀释的WB**（1X Wash Buffer） 以1:1000比例（如：添加 1ul 的**CA** 到 1000ul 的**稀释的WB**<1X Wash Buffer>）**稀释CA**（Capture Antibody）。每个分析孔中大概需要添加50ul 的**稀释的 CA**。

e. 制备**稀释的 DA**：

使用**稀释的WB**（1X Wash Buffer） 以1:2000比例（如：添加 1ul 的**DA** 到 2000ul 的**稀释的WB**<1X Wash Buffer>）**稀释DA**（Detection Antibody）。每个分析孔中大概需要添加 50ul 的**稀释的 DA**。

f. 制备**稀释的 ES**：

使用**稀释的WB**（1X Wash Buffer） 以1:5000比例（如：添加 1ul 的**ES** 到 5000ul 的**稀释的WB**<1X Wash Buffer>）**稀释ES**。每个分析孔中大概需要添加 50ul 的**稀释的ES**。

g.制备**稀释的AS**：

建议的标准曲线：第一，使用 **DB** 稀释 **AS** 到 1ng/ul 通过添加 5ul 的 **AS** 到 5ul 的**DB**中。然后，根据如下稀释表结合使用 1ng/ul **稀释的 AS** 和 **DB** 制备6种不同浓度，0.02，0.05，0.1，0.2，0.5和1.0ng/ul。

| 管子 | AS(1 ng/ul) | DB | PC终浓度 |
|---|---|---|---|
| 1 | 1.0 ul | 39.0 ul | 0.02ng/ul |
| 2 | 1.0 ul | 19.0 ul | 0.05ng/ul |
| 3 | 1.0 ul | 9.0 ul | 0.1ng/ul |
| 4 | 1.0 ul | 4.0 ul | 0.2ng/ul |
| 5 | 2.0 ul | 2.0 ul | 0.5ng/ul |
| 6 | 4.0 ul | 0.0 ul | 1.0ng/ul |

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

**2. 酶促反应：**

a. 根据实验预先计算所需的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）。

b. 添加 80 ul 的 **BS**（结合液）到每孔中。

c. 添加 2 ul 的 **1X MS**到空白孔和样本孔中。添加 1 ul 的 **稀释的AS** 到标准曲线孔（参考表1设置的孔位，在下面的建议的条孔设置）。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。

注：对于标准曲线，以步骤1g表中准备好的浓度0.02-1 ng/ul 添加 1 ul 的 **稀释的 AS**。每孔最终的浓度应该是0.02，0.05，0.1，0.2，0.5和1 ng。

d. 使用封板膜或封口条封好联管并在37° C孵育90分钟。
e. 从每孔上移走 **BS**（结合液）。
f. 每次使用150 ul **稀释的 WB** （1X Wash Buffer）清洗每孔并三次。
g. 空白孔：添加 50ul 的**终浓度 DB** 到每个空白孔中。
h. 标准孔：添加 50ul 的**终浓度 DB** 到每个标准孔中。
i. 无核蛋白的对照孔：添加 45-48ul 的**终浓度 DB** 和 2-5ul 的你的蛋白
j. 无抑制剂的样本孔： 添加 46-49ul 的**终浓度 DB** 和 1-4ul 的核蛋白或纯化的酶到不含抑制剂的样本孔中。总体积应该是每孔 50ul 。
k. 含抑制剂的样本孔： 添加 41-44ul 的**终浓度 DB** 和 1-4ul 的核蛋白或纯化的酶和 5ul 的抑制剂溶液到孔中。总体积应该是每孔 50ul 。

   注：1）遵循建议的设置孔图表，如下：建议的条孔设置；2）我们推荐每孔使用 5ug-10ug 核蛋白或 50ng-500ng 纯化酶。3）添加到样本孔的抑制剂浓度是可以调整的（1uM- 1000uM）。然而，在添加到孔之前抑制剂的最终浓度应该以1:10的比例来准备（如：添加0.5ul 的抑制剂到 4.5ul 的 **DB**）。为了使抑制剂的原溶剂减少至 1% 的反应溶液或更少。

l. 使用石蜡封口膜紧紧的封住板子为了避免在 37 °C 持续孵育 60-90分钟溶液蒸发。

   注：孵育时间取决于本来固有的酶活性。然而，一般来说，60分钟孵育对于纯化的 m6A 去甲基化酶活性是比较理想的；90分钟孵育对于核蛋白是比较合适的。

m. 从每个孔中移走反应的溶液。每次使用 150ul 的**稀释的 WB**（1X Wash Buffer）清洗每个孔三次。

**3. 抗体结合和增强信号：**

a. 添加 50 ul 的**稀释液 CA** 到每孔中，然后使用石蜡封口膜或铝箔纸覆盖并在室温下孵育 60 分钟。

b. 使用移液器从每孔中移走 **稀释的 CA** 。

c. 每次使用 150 ul 的**稀释的 WB**（1X Wash Buffer） 清洗每孔3次。

d. 添加 50 ul 的**稀释的 DA** 到每孔，然后使用石蜡封口膜或铝箔纸覆盖并在室温下孵育 30 分钟。

e. 使用移液器从每孔中移走 **稀释的 DA** 。

f. 每次使用 150 ul 的**稀释的 WB**（1X Wash Buffer）清洗每孔4次。

g. 添加 50 ul 的**稀释的 ES** 到每孔，然后使用石蜡封口膜或铝箔纸覆盖并在室温下孵育 30 分钟。

h. 使用移液器从每孔中移走 **稀释的 ES** 。

i. 每次使用 150 ul 的**稀释的 WB**（1X Wash Buffer） 清洗每孔5次。

注：在每次清洗步骤中确保任何残留在孔中的清洗液都被彻底的移走。执行清洗可以采用移液器将清洗液添加到孔中，然后再从孔中吸走来完成（丢弃废液）。

**4. 信号检测：**

a. 添加 100 ul 的 **DS** 到每孔中并室温避光孵育 1-10 分钟。开始监测样本孔和阳性对照孔的颜色变化。在充足的 核蛋白或纯化酶 下，**DS** 溶液将变成蓝色。

b.当阳性对照孔的颜色变成中度蓝色时，需添加 100 ul 的 **SS** 到每孔中终止酶反应。在添加 **SS** 后，颜色将变成黄色；并在2-10分钟内使用酶标仪读取在 450 nm 处使用备选的波长655nm处的吸光值。

注：1）大多数的酶标仪都可以执行双波长分析并且能够从测试波长吸光值中自动扣减参考波长的吸光值。如果您的板子读取仪没有这个功能，可以读取板子两次，一次是在450nm 处，另外一次是在 655nm 处。然后从450 nm 处的吸光值中手动扣减 655 nm 处的OD值。2）联管板架不适合酶标仪，转移溶液到一个新的96微孔板中。

**5. 计算m$^6$A去甲基化酶活性**

a.计算样本孔和空白孔各二次平均值的读数。

b.使用如下的计算公式来计算酶的活性货抑制剂：相对定量：确定二份不同样本RNA中相对定量的 m$^6$A RNA 甲基化状态，采用如下的公式简单计算总RNA中 m$^6$A 的百分比。

$$\text{Demethylase activity (OD/h/mg)} = \frac{[\text{OD (control\#} - \text{blank)} - \text{OD (sample} - \text{blank)}]}{[\text{Protein Amount } (\mu g)/1000]^{*} \times \text{Hour}^{**}}$$

#不含核蛋白的对照孔
*在第2j步骤添加在反应里面的蛋白数
**在第2l步骤（in hours）中的孵育时间

计算举例：
样本 OD450 均值是0.65
空白 OD450 均值是0.05
蛋白数量是 5ug
孵育时间是：1小时（60分钟）

$$\text{Activity} = \frac{(0.65 - 0.05)}{(5 \times 60)} \times 1000 = 2 \text{ OD/min/mg}$$

精确的或特异活性的计算：首先，绘制一个标准曲线并且绘制每个浓度点 与 **AS** 数量对应的OD值。其次，使用线性回归以OD/ng 来确定斜率。（Microsoft Excel的线性回归函数或斜率适用于这样的计算）。使用最标准的线性回归(至少包含4个浓度点)绘制理想斜率。现在，使用如下的公式计算$m^6A$ DNA去甲基化酶活性。

$$\text{Activity (ng/h/mg)} = \frac{[\text{OD (control\# – blank) – OD (sample – blank)}]}{\text{Slope} \times \text{Protein Amount (µg)* X Hour **}} \times 1000$$

#不含核蛋白的对照孔
*在第2j步骤添加在反应里面的蛋白数
**在第2l步骤（in hours）中的孵育时间

抑制剂的计算：

$$\text{Inhibition \%} = \left(1 - \frac{[\text{OD (control – blank) – OD (inhibitor sample – blank)}]}{[\text{OD (control – blank) – OD (no inhibitor sample – blank)}]}\right) \times 100\%$$

**建议微孔板的设置：**

**表1**：基于操作手册大概确定被定义的分析孔的缓冲液和溶液。

| **Reagents** | **1 well** | **1 strip (8 wells)** | **2 strips (16 wells)** | **6 strips (48 wells)** | **12 strips (96 wells)** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Diluted WB** | 2.5 ml | 20 ml | 40 ml | 120 ml | 240 ml |
| **DB** | 50 µl | 400 µl | 800 µl | 2400 µl | 4800 µl |
| **1 X MS** | 2 µl | 16 µl | 32 µl | 96 µl | 192 µl |
| **AS** | N/A | N/A | 4 µl (optional) | 8 µl | 8 µl |
| **BS** | 80 µl | 650 µl | 1350 µl | 2700 µl | 5400 µl |
| **Diluted CA** | 50 µl | 400 µl | 800 µl | 2400 µl | 4800 µl |
| **Diluted DA** | 50 µl | 400 µl | 800 µl | 2400 µl | 4800 µl |
| **Diluted ES** | 50 µl | 400 µl | 800 µl | 2400 µl | 4800 µl |
| **DS** | 0.1 ml | 0.8 ml | 1.6 ml | 4.8 ml | 9.6 ml |
| **SS** | 0.1 ml | 0.8 ml | 1.6 ml | 4.8 ml | 9.6 ml |

**表2**：我们建议在48次实验（在96次实验中，列7-12作为样本配置）中条孔的设置应该使用标准曲线。对照和样本应该是一式二份。

| Well # | Strip 1 | Strip 2 | Strip 3 | Strip 4 | Strip 5 | Strip 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| A | Blank | Blank | Sample | Sample | Sample | Sample |
| B | AS 0.02 ng/μl | AS 0.02 ng/μl | Sample | Sample | Sample | Sample |
| C | AS 0.05 ng/μl | AS 0.05 ng/μl | Sample | Sample | Sample | Sample |
| D | AS 0.1 ng/μl | AS 0.1 ng/μl | Sample | Sample | Sample | Sample |
| E | AS 0.2 ng/μl | AS 0.2 ng/μl | Sample | Sample | Sample | Sample |
| F | AS 0.5 ng/μl | AS 0.5 ng/μl | Sample | Sample | Sample | Sample |
| G | AS 1 ng/μl | AS 1 ng/μl | Sample | Sample | Sample | Sample |
| H | Sample | Sample | Sample | Sample | Sample | Sample |

# 附录

## 凝难解答

| 出现的问题 | 可能的原因 | 建议解决方法 |
|---|---|---|
| 在对照和样本孔中无信号或弱信号 | 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。 |
| | 底物和对照没有恰当的结合在孔上 | 确保 1）**MS** 和 **AS** 是添加到孔中；2）使用足够的 **BS**（Binding Buffer）完全可以覆盖住孔；和 3)结合的时间是足够的(92 分钟)。 |
| | 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。 |
| | 不正确的读取吸光值 | 检查酶标仪是否采用恰当的波长（450 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。 |
| 仅标准曲线孔中无信号或微弱信号 | 在第 2c 步没有添加足够数量的对照到孔中 | 确保添加足够数量的对照。 |
| | 由于不恰当的储存条件导致对照降解 | 遵守操作手册中对于对照 **AS**（Assay Standard）的运输和储存条件的说明。 |
| 在空白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。 |
| | 样本或对照受到污染 | 确保孔没有被样本或对照意外的被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 45 分钟。 |
| | 过度显色 | 在第 4b 步中添加 **SS**（终止液）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蛋白样本 | 确保您的操作手册是适合 DNA 去甲基的抽提。为了得到理想的结果，我们建议您采用我们的核蛋白抽提试剂盒货号：OP-0002。同样，对于蛋白抽提我们建议使用新鲜的细胞或组织标本，因为冷冻的细胞或组织可能酶的活性流失较多。 |
| | 加入到孔中的样本量不够 | 确保在第 2j 和 2k 步骤中使用了足够的数量的核蛋白。在这个分析实验中，可以对样本采用滴定法来确定最佳的数量。 |
| | 样本被不恰当的保存或保存时间太长 | 确保样本是以小份的保存在-80° C，对于核蛋白没有超过 6 周。避免反复冻融。 |
| | 样本中包含很少或无 $m^6A$ DNA 去甲基化活性 | 这个问题可能由于许多的因素导致的。如果不能确定影响因素，请使用新的或是再次制备的核蛋白。 |
| 过度的显色时间 | 没有足够的清洗净孔 | 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 到或 H 从孔 1 到孔 12)。 |

## 定购信息

| 货号 | 品名 | 规格 |
|---|---|---|
| A-P-9013 | $m^6A$ 去甲基化酶活性/抑制分析试剂盒（比色法） | 48 次、96 次 |
| A-P-9005 | $m^6A$ RNA 甲基化定量检测试剂盒(比色法) | 48 次、96 次 |
| A-P-9008 | $m^6A$ 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 |
| A-P-9003 | RNA 甲基化修饰试剂盒 | 50 次、100 次 |

## 推荐产品

| 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 |

**RNA 和 microRNA 样本的制备:**

**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，传真或邮件定购:

技术电话：010－57225208；传真：010－52406250；

邮件： ordering@aderr.com

2. 在线定单定购:

**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

**公众号：AD-Bio** **订阅号：Bio-888**

**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