



*仅用于实验室，不用于诊断与治疗。请随时跟我们索取并使用最新版本的说明书。

m⁶A RNA甲基化片段富集试剂盒

此品非常适合从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感兴趣的样本中提取总RNA来富集片段化的含有m⁶A的RNA。整个实验时间不到3小时。手动操作不到30分钟。

目录号： A-P-9018（48次、24次）

操作手册

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

2020年5月，第1版，对应英文第20200506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

目录表.....	2
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.....	7
用法.....	8
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。.....	8
附录.....	10
疑难解答.....	10
订购信息.....	10
推荐产品.....	11
相关产品.....	11
如何下单.....	11

试剂盒组成

内容	A-P-9018-24 (24次)	A-P-9018-48 (2X24次)	保存条件
WB (Wash Buffer)	30 ml	2X30 ml	4° C
ICB (Immuno Capture Buffer)	4 ml	2X4 ml	常温
NDE (Nuclear Digestion Enhancer)	300 ul	2X300 ul	常温
CEM (Cleavage Enzyme Mix)*	60 ul	1200 ul	-20° C
m⁶A Antibody (1mg/ml)*	50 ul	100 ul	-20° C
Non-Immune IgG (1mg/ml) *	20 ul	40 ul	4° C
m⁶A-Positive Control (200ug/ml) **	6 ul	12 ul	-20° C
PDB (Protein Digestion Buffer)	5 ml	10 ml	常温
Proteinase K (10mg/ml) *	100 ul	200 ul	4° C
Affinity Beads*	100 ul	200 ul	4° C
DPS (DNA Puritication Solution)	600 ul	2X600 ul	常温
DNA Binding Beads *	60 ul	120 ul	4° C
Elution Buffer	2000ul	4000ul	常温
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。

**m⁶A-Positive Control是一种含有m⁶A的合成低聚糖。

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**CEM、m⁶A Antibody** 和 **m⁶A-Positive Control** 在-20° C下避光保存；
- 2) **WB、Non-Immune IgG、Proteinase K、Affinity Beads** 和 **DNA Binding Buffer** 在4° C避光保存；
- 3) 剩余的组件（**ICB、NDE、PDB、DPS** 和 **Elution Buffer**）室温避光保存。

注：在使用前检查**WB（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。在合适的保存条件下，所有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)

- 涡旋混合仪
- 带48孔或96孔模块的热循环仪
- 离心机包括台式离心机(每分钟14,000rpm)
- 安捷伦的生物分析仪或评估DNA文库质量的可比方法
- 微孔板涡旋仪或滚动摇床
- 磁力设备(96孔板形式的, 可参考: [96孔磁珠分选板-A-Q10002](#))
- 可调移液器和移液吸头
- 0.2ml 或 0.5ml 的 PCR管
- 1.5 ml 离心管(需要灭菌处理)
- RNA样本
- 100%乙醇
- 1X TE buffer
- 蒸馏水

重点提示

使用必读:

使用: m⁶A RNA甲基化片段富集试剂盒 专门从低输入的RNA中来富集含有m⁶A的RNA片段并通过PCR或利用Illumina平台或其他方法进行下一代测序, 获得完整的转录体m⁶A。该工具包的创新工作原理、优化协议和组件允许以最小的非特异性背景水平来捕获m⁶A片段。富集的RNA特别适合于快速构建非条形码(单个)和条形码(多个)文库, 使m⁶A区域能够以较少的偏差和较高的位置来映射。

起始材料: 输入材料可以是总RNA。原始材料可以包括各种哺乳动物细胞样本, 如从烧瓶或板子中培养细胞、从血液、体液和新鲜/冷冻组织中分离出的原代细胞或稀有细胞群体, 从整个细胞群和胚胎细胞中分离的特定细胞等。

输入量: 每次反应的总RNA量范围是: 1ug - 20ug, 且最佳的范围是: 10ug RNA。使用这款试剂盒的总RNA量可低至 - 500ng。

抗体: 本试剂盒中使用的抗m⁶A兔多克隆抗体对m⁶A RNA片段具有高度特异性, Me RIP级, 与腺嘌呤未甲基化RNA片段没有交叉反应。

内控: 本试剂盒内提供阳性对照。

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m⁶A RNA甲基化片段富集试剂盒的生产,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或加微信:[hugasis](https://www.wechat.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,和适当的防护眼罩来使用这款产品。

产品更新:

A&D Technology Corporation有权更改或修改产品内容,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:

m⁶A RNA甲基化片段富集试剂盒是为研究用途,不适合诊断或治疗的应用。

知识产权:

m⁶A RNA甲基化片段富集试剂盒中使用的原理和方法,我司有产品使用的追索权。

产品简介

众所周知, N⁶-甲基腺苷(m⁶A)是真核生物RNA分子中最常见和最丰富的修饰。由甲基转移酶复合物METTL3催化m⁶A修饰,并通过M⁶A RNA去甲基化酶FTO和ALKBH5,以 α -酮戊二酸(α -KG)-和Fe²⁺-依赖的方式催化M⁶A去甲基化。METTL3、FTO和ALKBH5在许多生物中起着重要作用,从发育和代谢到生育的过程。在所有RNA碱基甲基化中,m⁶A占80%以上,存在于各种物种中。m⁶A主要分布在mRNA中同样也发生在非编码RNA中,如tRNA、rRNA和snRNA。在mRNA转录物中m⁶A的相对丰度已被证明影响RNA代谢过程,如剪接,核输出,翻译能力和稳定性,以及RNA转录。由m⁶A RNA甲基酶和脱甲基酶缺陷引起的m⁶A甲基化水平异常可能导致RNA功能障碍并引起疾病。例如,由于FTO突变患者的FTO活性增加,靶mRNA中m⁶A的异常低水平,通过一种未定义的途径,导致肥胖和相关疾病的发生。对RNA的化学M⁶A修饰的动态性和可逆性,也可作为一种具有深远生物学意义的新表观遗传标记。因此,更多有用的信息,以更好地理解m⁶A RNA甲基化 RNA 转录物的水平和分布有利于疾病的诊断和治疗。目前,有几种方法被用于表位范围的m⁶A映射。这些方法包括MeRIP, PA-m⁶A-seq, miCLIP和m⁶A-CLIP。MeRIP已被广泛应用,但在m⁶A分析中无法实现高分辨率。PA-m⁶A-seq、mi CLIP和m⁶A-CLIP提高了分析分辨率,但由于重复性差和工艺复杂。特别是,这些方法耗时(>2天)和费用昂贵。为了解决这些问题,A&D Technology Corporation联合开发了一种新的方法:CUT&RUN M⁶A富集(利用核酸酶对m⁶A进行裂解和回收)。我们的创新方法将MeRIP和m⁶A-CLIP的优点与最快的程序结合起来特别的推出了:m⁶A RNA甲基化片段富集试剂盒。

m⁶A RNA甲基化片段富集试剂盒 具有以下优势和特点:

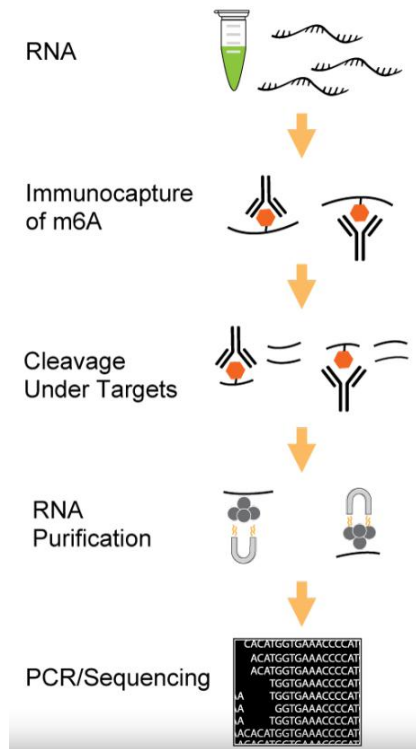
- **高度富集:** 使用RNA切割酶混合物同时对含有m⁶A的目标序列两端的RNA进行片段化和切割/移除任何RNA序列,而不影响被抗体占据的RNA区域。短片段RNA仅与抗m⁶A抗体结合。因此,非常可靠地确定真正的m⁶A富集目标区域,并可实现高分辨率绘图。
- **低输入:** 不结合的RNA切割和免疫捕获是在同一个单管中处理的,这样可最大限度地保护含有m⁶A的目标区域,并最小化样本损失,允许输入RNA低至500ng。
- **极小背景:** 在含m⁶A目标序列的两(2)端切割非结合RNA序列,可最小化MeRIP/测序背景,允许1000万读的数据分析。。
- **超快速、精简程序:** 从RNA到cDNA文库的过程小于3小时,动手时间<30分钟。
- **超级方便:** 本试剂盒包含了每一步所需的所有组件,这足以捕获含m⁶A的RNA序列,从而允许以一种很方便的方法来富集,结果可靠一致。

相关参考文献:

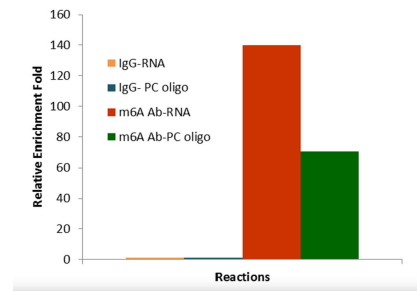
1. Niu Y et al: Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 11:2013.
2. Cantara WA, et al. NucleicAcids Res. 2011; 39: D195-201.
3. Motorin Y, Helm M.Nucleic Acids Res. 2010;38(5): 1415-1430.
4. Squires JE, Preiss T.Epigenomics. 2010; 2(5):709-715.
5. Chow CS, et al. ACSChem Biol. 2007; 2(9): 610-619.
6.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

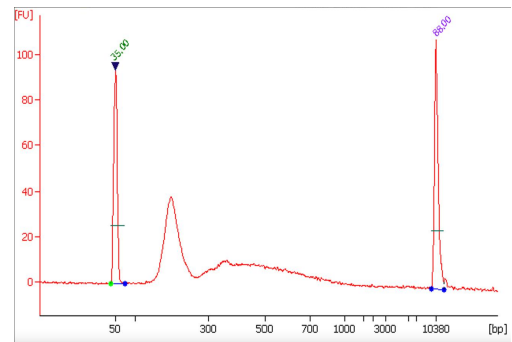
m⁶A RNA甲基化片段富集试剂盒 包含从总RNA开始进行成功的m⁶A RNA富集所需的所有必要试剂。在反应中，含有m⁶A目标区域两端的RNA序列被裂解/去除，含有m⁶A目标片段被使用磁珠结合的m⁶A捕获抗体拉下。然后，富集的RNA被释放、纯化和洗脱。试剂盒包括非免疫IgG对照和m⁶A阳性对照。这些可以用来证明试剂盒的有效性和在富集RNA定量或生物分析仪步骤的性能。



图示 1：使用 m⁶A RNA 甲基化片段富集试剂盒流程图。



图示 2：使用 m⁶A RNA 甲基化富集试剂盒富集含有 m⁶A RNA 片段：采用抗 M6A 抗体(#A-1801)从 10μg 总人类 RNA 和 500ng 阳性对照寡糖中捕获含有 m⁶A 的 RNA 片段。非免疫 IgG 作为阴性对照。对富集 RNA 进行纯化，荧光定量进行富集倍数比较。



图示 3：文库片段的大小分布：用抗 m⁶A 抗体(#A-1801)从 5μg 的人类总 RNA 中富集 m⁶A 片段，并用于 cDNA 文库制备。峰值在 195bps 反映了由 m⁶A 抗体结合的 RNA 大小(约 55bps)。

程序概述和估计时间表：

步骤	大约：所需时间
m ⁶ A 捕获和裂解	100分钟
富集RNA的释放和纯化	40分钟

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: 每次反应的总RNA数量范围是: 1ug - 20ug。最佳数量是: 每次反应是10ug，m6A含量一般小于总RNA的0.1%。起始RNA可能在水中或缓冲液中，如TE。RNA应该是高质量的，没有DNA污染。可以用DNase去除DNA，RNA应在无RNase的水中洗脱。

RNA储存: RNA应该储存在 -20° C 或 80° C直至使用为止。

1. 免疫捕获和裂解:

a. 根据如下表格将试剂加入0.2ml 的PCR管中，配制免疫捕捉液，并混匀:

试剂	样本	Non-Immune IgG	Positive Control
ICB(Immuno Capture Buffer)	174-189 ul	174-189 ul	191ul
m6A antibody	2 ul	0	2ul
RNA sample	5-20 ul	5-20 ul	0
Non-Immune IgG	0	2 ul	0
Positive control oligo	0	0	3 ul
Affinity Beads	4 ul	4 ul	4 ul
Total Volume	200ul	200ul	200ul

注: 1) 每个组成部分的最后数额应为 (a) 感兴趣的抗体: 2μg/管和(b) 非免疫IgG: 2μg/管。
2) 摇动 **Affinity Beads**，在使用前使其完全悬浮。

b. 室温下，在涡旋仪涡旋管子或在滚动的摇床上，涡旋90分钟。

c. 经过90分钟的孵育后，添加 10ul 的 **NDE (Nuclear Digestion Enhancer)**，2ul 的 **CEM (Cleavage Enzyme Mix)** 到每个管子中并室温孵育4分钟。

d. 把管子放在磁力架上，直至溶液澄清(约2分钟)。小心移除并丢弃上清液(注意: 小心不要干扰或丢弃含有DNA的珠子)。:

输入可以根据如下步骤剪切

在20μl **ICB (Immuno Capture Buffer)** 中加入1-2μl (200-400ng) 的RNA，然后加入1.5μl **NDE (Nuclear Digestion Enhancer)**、1μl **CEM (Cleavage Enzyme Mix)** 在室温下孵育2分钟。然后进入2d步骤进行RNA释放/回收。

e. 将PCR管保存在磁力架中，用150μl **WB (Wash Buffer)** 清洗每个反应管三次，并用150μl **PDB (Protein Digestion Buffer)** 清洗一次。清洗可按如下进行:

溶液去除后，在反应管中加入**WB (Wash Buffer)**。轻轻地上下移动几次，重新悬浮珠子。确保珠子完全重新悬浮并且珠子不会粘在吸头尖处。将管子放回磁力架中1-2分钟，使珠子颗粒化，然后从每次反应中取出并丢弃溶液。



2. 富集RNA的释放/回收:

- a. 用**Proteinase K**与**PDB (Protein Digestion Buffer)**以1:10 (例如: 1ul 的**Proteinase K + 9ul PDB<Protein Digestion Buffer>**) 来制备 **Protein Digestion Solution**。
- b. 最后一次清洗后, 从磁力架上取出管子。在每个样品和阴性对照中加入 **20μl Protein Digestion Solution**。在热循环仪中(没有加热盖子)55° C下混合和孵育15分钟。
- c. 把管子放在磁力架上, 直至溶液澄清 (约2分钟)。小心地将溶液从每个样品转移到一个未使用的PCR管中。
- d. 在每个样品和阴性对照管中填加20 ul 的**DPS (DNA Purification Solution)**, 然后加入160 ul的 100% 乙醇。将25 ul的 **DPS (DNA Purification Solution)** 放入输入管中, 然后加入200 ul的100% 乙醇。
- e. 通过涡旋重新悬浮**DNA Binding Beads**。 在每个管子中加入 2μl 再悬浮的珠子。 通过移液器上下吹打至少10次, 彻底混匀。
- f. 室温下孵育5分钟, 使DNA与珠子结合。
- g. 将PCR管放入磁力架, 直到溶液清澈 (约2分钟)。 小心移除并丢弃上清液。 (注意: 小心不要搅乱或丢弃那些有可能含有DNA的珠子)。
- h. 将PCR管放入磁力架中, 在管中填加 150μl 新鲜制备的 **90%乙醇**, 然后小心地取出并丢弃乙醇。
- i. 重复步骤2g一次, 共洗两次。
- j. 将珠子重新悬浮在 13μl 的 **Elution Buffer** 中, 室温孵育5分钟, 从珠子中释放DNA。
- k. 通过将管子放置在磁力架中捕捉珠子, 直到溶液完全清晰 (约1分钟)。
- l. 从每个样品中转移 13μl 到新的 0.2ml PCR管中, 立即使用或储存在-20° C。

注: (1) 富集RNA的浓度可以用荧光法简单地定量, 通过阳性对照和阴性对照的比较或在样品和IgG对照之间。 例如, 取1ul 洗脱RNA采用RNA或ssDNA定量方法对其进行定量; (2) 使用富集RNA基于测序可进行文库构建, 或您可使用您自己成功的RNA文库构建方法或使用从Illumina或NEB提供的RNA文库制备试剂盒。

附录

疑难解答

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
样品中富集的 DNA 很少或没有。	合格的 RNA 或含 m6A 的 RNA 数量不足。	使用更多数量的 RNA。
	使用的抗体富集效率不高。	检查免疫捕获条件是否正确。
	不恰当的 RNA 片段化条件。	由于储存温度不当， CEM (Cleavage Enzyme Mix) 可能降解。确保该组件的适当存储条件。 CEM (Cleavage Enzyme Mix) 混合反应时间过短或过长。应优化裂解条件，使 RNA 片段大小在 30-200 bps 之间。
	RNA 释放过程中温度不正确和/或时间不足。	确保正确遵循操作手册中描述的适当孵育时间和温度。
	每个反应步骤反应条件不当。	检查试剂是否正确添加，每个反应步骤的孵育温度和时间是否正确，包括 RT 反应、文库合成和扩增。
	不恰当的储存试剂盒。	确保试剂盒没有超过效期。正常储存的标准保质期为收到之日起 6 个月。
阴性对照与样品间富集 RNA 强度无差异。	清洗不足。	检查每个步骤的洗涤建议是否严格按照操作手册执行的。如果阴性对照中的信号强度仍然较高，则可按照如下的方法来提高洗涤强度。 1. 增加每个洗涤步骤的洗涤时间：加入 WB (Wash Buffer) 后，将其留在孔中 3-4 分钟，然后将其移走。 2. 使用 WB (Wash Buffer) 添加一个额外的清洗步骤：提供 WB (Wash Buffer) 的体积足以为每个样品额外清洗 4 次。

订购信息

货号	品名	规格
A-P-9018	m ⁶ A RNA 甲基化片段富集试剂盒	48 次、24 次
A-P-9019	m ⁶ A 甲基化酶活性/抑制分析试剂盒（比色法）	48 次、96 次
A-P-9013	m ⁶ A 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 ⁶ A RNA 甲基化定量检测试剂盒(比色法)	48 次、96 次
A-P-9008	m ⁶ A 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

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-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>



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