



\*仅用于科学研究，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。

## m<sup>6</sup>A RNA甲基化文库构建试剂盒（测序版）

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 m<sup>6</sup>A 的 RNA。整个实验时间不到 6 小时。手动操作不到 1 小时。【学习更多视频请关注视频号：艾维缔®；哔哩哔哩：IVDSHOW®；抖音：军哥聊表观。】

目录号： A-P-9016（24次、12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：1951545998@qq.com



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 .....	4
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
凝难解答 .....	14
推荐产品 .....	15
如何下单 .....	16

## 试剂盒组成

### 针对 m6A 捕获反应

内容	A-P-9016-12 (12次)	A-P-9016-24 (24次)	保存条件
<b>WB</b> (Wash Buffer)	<b>15 ml</b>	<b>30 ml</b>	4° C
<b>CB</b> (Capture Buffer)	<b>2 ml</b>	<b>4 ml</b>	常温
<b>NDE</b> (Nuclear Digestion Enhancer)	<b>150 ul</b>	<b>300 ul</b>	常温
<b>CEM</b> (Cleavage Enzyme Mix)*	<b>30 ul</b>	<b>60 ul</b>	-20° C
<b>m6A Antibody</b> (1mg/ml)*	<b>25 ul</b>	<b>50 ul</b>	-20° C
<b>Non-Immune IgG</b> (1mg/ml) *	<b>10 ul</b>	<b>20 ul</b>	4° C
<b>PDB</b> (Protein Digestion Buffer)	<b>2.5 ml</b>	<b>5 ml</b>	常温
<b>Proteinase K</b> (10mg/ml) *	<b>50 ul</b>	<b>100 ul</b>	4° C
<b>Affinity Beads*</b>	<b>50 ul</b>	<b>100 ul</b>	4° C
<b>RPS</b> (RNA Purification Solution)	<b>300 ul</b>	<b>600 ul</b>	常温
<b>RNA Binding Beads *</b>	<b>30 ul</b>	<b>60 ul</b>	4° C
<b>Elution Buffer</b>	<b>1 ml</b>	<b>2 ml</b>	常温

### 针对文库构建

内容	A-P-9016-12 (12次)	A-P-9016-24 (24次)	保存条件
<b>5X Reaction Buffer *</b>	<b>100 ul</b>	<b>200 ul</b>	-20° C
<b>RT Enzyme Mix *</b>	<b>13 ul</b>	<b>26 ul</b>	-20° C
<b>Adaptor-A (10uM) *</b>	<b>28 ul</b>	<b>56 ul</b>	-20° C
<b>Reaction Enzyme Mix *</b>	<b>25 ul</b>	<b>50 ul</b>	-20° C
<b>Adaptor-B (10uM) *</b>	<b>28 ul</b>	<b>56 ul</b>	-20° C
<b>MQ Binding Beads *</b>	<b>1.8 ml</b>	<b>3.6 ml</b>	4° C
<b>2X HiFi PCR Master Mix *</b>	<b>160 ul</b>	<b>320 ul</b>	-20° C
<b>Primer U (10uM) *</b>	<b>15 ul</b>	<b>30 ul</b>	-20° C
<b>Primer I (10uM) *</b>	<b>15 ul</b>	<b>30 ul</b>	-20° C

\*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：可根据以上表格建议的储存温度将试剂进行避光保存。

**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文库质量的同类方法
- 微孔板涡旋仪或滚动摇床
- IVDSHOW® 16孔磁力架 或 96孔磁力架
- 可调移液器和移液吸头
- 0.2ml 或 0.5ml 的 PCR管
- 1.5 ml 离心管
- RNA样本
- 100%乙醇
- 90%乙醇（新鲜配置）
- 1X TE buffer
- 蒸馏水

## 重点提示

使用必读：

**使用：** m6A RNA甲基化文库构建试剂盒（测序版）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 基因分析仪II代平台HiSeq 和 MiSeq系统或其他方法进行下一代测序，获得完整的转录体m6A制备文库。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分辨率来映射。



**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：**通常,每次反应的总RNA量范围是：1ug - 20ug 。为了得到更好的制备，建议最佳的输入量是：10ug RNA。使用这款试剂盒的总RNA量可低至 - 500ng 获得测序数据 。

**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，与未甲基化的腺嘌呤RNA片段没有交叉反应。

**内控：**本试剂盒内提供阴性对照 non-immune IgG。

**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甲基化文库构建试剂盒（测序版）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:[1951545998@qq.com](mailto:1951545998@qq.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甲基化文库构建试剂盒（测序版）是为研究用途,不适合诊断或治疗的应用。

**知识产权：**

m6A RNA甲基化文库构建试剂盒（测序版）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 $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -KG)-和Fe<sup>2+</sup>-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甲基氧化 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 RNA-测序(利用核酸酶对m6A测序进行裂解和回收)。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甲基化文库构建试剂盒(测序版)**。

**m6A RNA甲基化文库构建试剂盒(测序版)** 具有以下优势和特点:

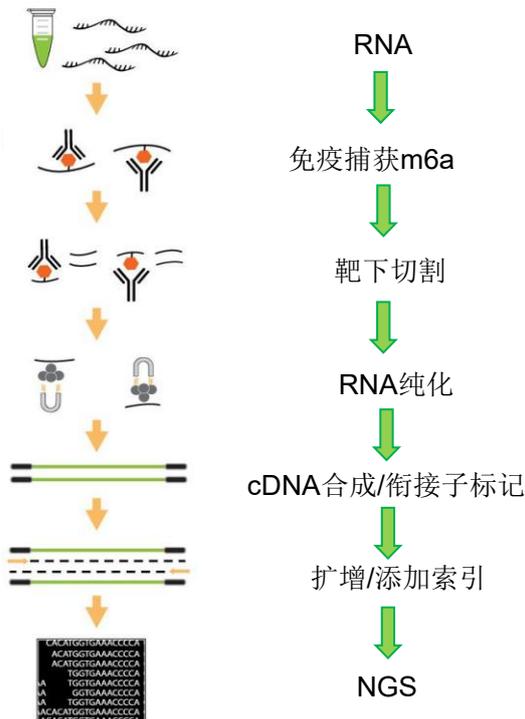
- **高度富集:** 使用RNA切割酶混合物同时对含有m6A的目标序列两端的RNA进行片段化和切割/移除任何RNA序列,而不影响被抗体捕获的RNA区域。短片段RNA仅与抗m6A抗体结合。因此,非常可靠地确定真正的m6A富集目标区域,并可实现高分辨率绘图。
- **低输入:** 不结合的RNA切割和免疫捕获是在同一个单管中处理的,这样可最大限度地保护含有m6A的目标区域,并最小化样本损失,允许输入RNA低至500ng。
- **极低背景:** 在含m6A目标序列的两(2)端切割非结合RNA序列,可最小化MeRIP/测序背景,允许1000万读的数据分析。。
- **超快速、精简程序:** 从RNA到cDNA文库的过程小于6小时,动手时间<1小时。
- **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序列和cDNA文库制备,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:

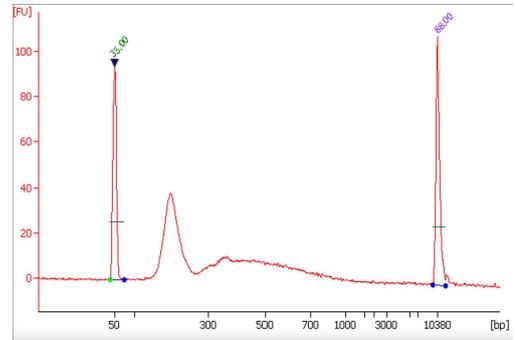
- Shabani D et. al. (April 2022). [Profiling m6A RNA Modifications in Low Amounts of Plant Cells Using Maize Meiocytes. \*Methods Mol Biol.\* 2484:313-331.](#)
- Jiang T et. al. (November 2022). [RNA m6A reader IGF2BP3 promotes metastasis of triple-negative breast cancer via SLIT2 repression. \*FASEB J.\* 36\(11\):e22618.](#)
- Hu Z et. al. (September 2022). [N6-methyladenosine of \*Socs1\* modulates macrophage inflammatory response in different stiffness environments. \*Int J Biol Sci.\* 18\(15\):5753-5769.](#)
- Li W et. al. (August 2022). [Comprehensive analysis of RNA m6A methylation in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. \*BMC Genomics.\* 23\(1\):576.](#)
- Chen D. et. al. (June 2022). [N6-methyladenosine methylation analysis reveals transcriptome-wide expression response to salt stress in rice roots \*Environmental and Experimental Botany.\* 201](#)

## 原理/步骤

**m6A RNA甲基化文库构建试剂盒（测序版）** 包含从总RNA开始进行成功的m6A RNA-测序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，含m6A的RNA目标片段被回收、被释放、被反转录、被剪切和连接。连接的第一链cDNA合成被扩增，然后被作为模板来构建文库。高保真的PCR预混酶对于文库cDNA的扩增和标定指数非常合适。最后使用结合的磁珠将cDNA进行清洗。试剂盒包括的阴性对照非免疫IgG，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 RN 甲基化文库构建试剂盒流程图。



图示 2：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
m6A 捕获和裂解	100分钟
逆转录和连接	150分钟
连接的cDNA 释放和纯化*	40分钟 *
文库扩增和纯化	50分钟

\***停止点**：在 在这一步产生的cDNA可以储存在-20° C，以便将来扩增使用。

## 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 I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
CB(Capture Buffer)	174-189 ul	174-189 ul
m6A antibody	2 ul	0
RNA sample	5-20 ul	5-20 ul
Non-Immune IgG	0	2 ul
Affinity Beads	4 ul	4 ul
<b>Total Volume</b>	<b>200ul</b>	<b>200ul</b>

**注:** 1) 每个组成部分的最后数额应为 (a) m6a抗体和(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5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Input【没有IP过的对照】可以根据如下步骤切割

在20μl **CB (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, 然后从每次反应管中取出并丢弃溶液。

### 2. 富集RNA的释放/回收:

【艾德科技】定货热线: +86-0313-5935521

技术支持: [1951545998@qq.com](mailto:1951545998@qq.com)

- a. 混合 **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 **RPS (RNA Purification Solution)**, 然后加入 160 ul 的 100% 乙醇。/此处, 接步骤 1d 到 1e 中间划线部分。将 25 ul 的 **RPS (RNA Purification Solution)** 放入输入管【Input】中, 然后加入 200 ul 的 100% 乙醇。
- e. 通过涡旋重新悬浮 **RNA 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 RNA 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 2h 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:** 可选的, 如果 RNA 的输入量 > 10μg, 则可以量化富集的 RNA。例如, 使用 RNA 或 ssDNA 定量方法, 取 1ul 洗脱 RNA 进行定量。IgG 阴性对照洗脱的体积可用于测定富集倍数。

### 3. 第一链 cDNA 的合成:

- a. 根据如下表格一在 0.2ml 的 PCR 管中, 配制第一链 cDNA 合成反应液。

表一:第一链cDNA转化

组分	体积
Enriched RNA(from Step2)*	13 ul
<b>5X Reaction Buffer</b>	4 ul
<b>Adaptor-A(10uM)</b>	2 ul
<b>RT Enzyme Mix</b>	1 ul
<b>Total Volume</b>	<b>20ul</b>

**注\***: 如果富集的RNA 体积不到13ul,添加蒸馏水使得总体积达到20ul。

b.在42° C下, 在没有盖盖子的热循环仪中, 混合并孵育50分钟。(确保盖子温度达到25° C)。

#### 4. 第一链cDNA的纯化:

**注**: 为了确保在DNA纯化过程中**MQ Binding Buffer** 与样品溶液的正确比例, 在将珠子加入到样品管之前, 确保任何粘在吸管尖端外面的珠子溶液都被移走。

a.通过涡旋重新悬浮 **MQ Binding Beads**。

b.在cDNA合成反应的PC R管中准确加入50ul再悬浮珠。 在旋涡混合器上充分混合或吹打至少10次来混合。

c. 室温下孵育5分钟, 使DNA与珠子结合。

d. 将PC R管放在适当的磁力架上, 直到溶液清澈(约2分钟)。 小心移除并丢弃上清液。小心不要打扰或丢弃那些含有cDNA的珠子。

e.保持PCR管在磁力架上并添加 150ul 新鲜配置 90%乙醇 添加到管中。室温孵育1分钟, 然后小心地取出并丢弃乙醇。

f. 重复步骤4e两次, 共洗三次。

g. 打开PC R管和在空气持续2-3分钟凉干珠子, 同时保持管子放置在磁力架上。

h. 将珠子重新悬浮在 12μl 的 **Elution Buffer** 中, 在室温下孵育2分钟, 从磁珠上释放DNA。

i.通过把管子放在磁力架上 2分钟或者直到溶液完全透明, 来捕获珠子。

j.将12μl 透明溶液转移到新的0.2ml PC R管中进行文库合成。

#### 5. 文库合成:



a.根据如下表格二在0.2ml 的PCR管中, 配制文库合成反应液。

表二:第一链cDNA转化

组分	体积
First strand cDNA(from Step4)	12 ul
<b>5X Reaction Buffer</b>	4 ul
<b>Adaptor-B(10uM)</b>	2 ul
<b>Total Volume</b>	<b>18ul</b>

b.在98° C下, 混合并孵化2分钟 没有加热盖(确保盖子温度达到25° C)的热循环仪中, 其次是在冰上孵育2分钟。添加 2ul **Reaction Enzyme Mix** 并在37° C下无盖的热循环仪下孵育为60分钟。

## 6. 合成文库的纯化:

a.通过涡旋重新悬浮 **MQ Binding Beads**。

b.在文库合成反应液的PC R管中准确加入36ul再悬浮珠。 在旋涡混合器上充分混合或吹打至少10次来混合。

c. 室温下孵育5分钟, 使DNA与珠子结合。

d. 将PC R管放在适当的磁力架上, 直到溶液清澈(约2分钟)。 小心移除并丢弃上清液。小心不要打扰或丢弃那些含有DNA的珠子。

e.从磁力架上移走管子。添加 150ul 新鲜配置 90%乙醇 添加到管中重新悬浮珠子。将PC R管放在适当的磁力架上, 室温孵育1分钟, 然后小心地取出并丢弃乙醇。

f.保持PCR管在磁力架上并添加 150ul 新鲜配置 90%乙醇 添加到管中。室温孵育1分钟, 然后小心地取出并丢弃乙醇。

g. 重复步骤6f一次, 共洗三次。

h. 打开PC R管和在空气持续2-3分钟凉干珠子, 同时保持管子放置在磁力架上。

i. 将珠子重新悬浮在 12μl 的 **Elution Buffer** 中, 在室温下孵育2分钟, 从磁珠上释放DNA。

j.通过把管子放在磁力架上 2分钟或者直到溶液完全透明, 来捕获珠子。

k.将10.5μl 透明溶液转移到新的0.2ml PC R管中以便文库扩增和标定指数。

**注:** 取1ul洗脱的DNA, 用荧光法定量合成的cDNA的浓度, 在文库扩增第7步确定文库扩增

周期。建议使用我们的通用DNA定量试剂盒(货号:A-P-1020 猛戳:[详情](#))对合成的cDNA进行定量。

## 7.文库扩增和标定指数:

### a.准备PCR反应:

解冻所有反应组分,包括混合液和引物溶液。简单的通过涡旋混合。在使用过程中,请将组件置于冰上,并在使用后立即放回-20° C。按照表三的将各组分加入PCR管/孔中。

表三:文库扩增和标定指数

组分	体积
HiFi Master Mix (2X)	12.5 ul
<b>Primer U</b>	1 ul
<b>Primer I (或 Barcode index)</b>	1 ul
<b>Synthesized library DNA(from Step 6)</b>	10.5 ul
<b>Total Volume</b>	<b>25 ul</b>

**重要提示:** (1)使用试剂盒中包含的**Primer I** 将生成一个单路复用的文库。对于多路复用文库准备,将Primer I均可替换为EpiNext NGS文库条码套装 -12 (货号: A-P-1060, 猛戳:[详情](#))中包含的12个不同的条形码(索引)之一,以生成每个索引库。还可以添加用户自定义的条形码(与Illumina兼容的),而不是Primer I。(2)每个索引库可以等量组合,形成多路复用库,用于测序。(3)利用qPCR、Qubit或Picogreen等方法对检索库的数量进行量化。

### b.设置PCR反应:

将反应板放入仪器中,并设置PCR条件如下:

循环步骤	温度	时间	循环数
Activation	98° C	30秒	1
Cycling	98° C	10秒	可调的*
	72° C	20秒	
Final Extension	72° C	2分钟	1

**注:** PCR循环数可能因连接的DNA浓度而不同。一般来说,针对8ng连接的DNA 使用14个循环数,针对2ng连接的DNA 使用17个循环数,针对0.5ng连接的DNA 使用21个循环数。进一步优化PCR循环数,要取决于需求。

## 8.扩增文库的纯化:

### a.通过涡旋重新悬浮 MQ Binding Beads。

b.在文库扩增反应的PCR管中准确加入20ul (0.8x) 再悬磁珠。在旋涡仪上充分混合或吹打至少10次来混合。

c. 室温下孵育5分钟,使DNA与珠子结合。

- d. 将PCR管放在适当的磁力架上，直到溶液清澈（约2-3分钟）。小心移除并丢弃上清液。小心不要打扰或丢弃那些含有DNA的珠子。
- e. 保持PCR管在磁力架上并添加 150ul 新鲜配置 90%乙醇 添加到管中。室温孵育1分钟，然后小心地取出并丢弃乙醇。
- f. 从磁力架上移走管子。添加 150ul 新鲜配置 90%乙醇 添加到管中重新悬浮珠子。将PCR管放在适当的磁力架上，室温孵育1分钟，然后小心地取出并丢弃乙醇。
- g. 重复步骤8f一次，共洗三次。
- h. 打开PCR管并在空气持续2-3分钟凉干珠子，同时保持管子放置在磁力架上。
- i. 将珠子重新悬浮在 10μl 的 **Elution Buffer** 中，在室温下孵育2分钟，从磁珠上释放DNA。
- j. 通过把管子放在磁力架上 2-3分钟或者直到溶液完全透明来捕获珠子。
- k. 将10μl 透明溶液转移到新的0.2ml PCR管中立刻使用或储存在-20° C以备测序使用。

**注：** (1)所制备的文库质量可采用安捷伦生物分析仪或可比方法进行评价。文库片段应该具有正确的大小分布(例如:峰值大小为200-300个bps)，而不需要适配器或适配器二聚体(约130个bps)。(2)检查大小分布，用水稀释库(如有必要)，并将其涂于安捷伦高灵敏度芯片上。如果存在150 bp的适配器二聚体，推荐使用0.9X **MQ Binding Beads** 去除150 bp以下的片段。(3)利用qPCR或荧光法，如NGS12种条码索引套装 (货号: A-P-1060, 猛戳: [详情](#))、Qubit或Picogreen等，可以对检索库的数量进行定量。(4)每个索引库可以等量组合，形成多路复用库进行测序。

将准备好的文库储存在-20° C，以备后续测序使用。

## 疑难解答

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
样品中的 cDNA 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, <b>CEM (Cleavage Enzyme Mix)</b> 可能降解。确保该组件的适当存储条件。 <b>CEM (Cleavage Enzyme Mix)</b> 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 <b>WB (Wash Buffer)</b> 后, 将其留在孔中 3-4 分钟, 然后将其移走。 2. 使用 <b>WB (Wash Buffer)</b> 添加一个额外的清洗步骤: 提供 <b>WB (Wash Buffer)</b> 的体积足以为每个样品额外清洗 4 次。
安捷伦生物分析仪检测到的异常峰值: 存在 <150 bp 适配二聚体或存在比预期更大的片段。	在片段分选中 DNA 的体积与 <b>MQ Binding Beads</b> 的比例不当。	检查 <b>MQ Binding Beads</b> 的正确体积是否相应地添加到 DNA 溶液中。适当的比例应该可以去除非峰值和异常峰值大小的片段。
	文库过度扩增。	文库的过度扩增所产生的 PCR 产物可能会导致片段种群的转移高于预期。确保使用适当的 PCR 周期来避免这个问题



## 推荐产品

货号	品名	规格
A-P-9016	m <sup>6</sup> A RNA 甲基化文库构建试剂盒(测序版)	24 次、12 次
A-P-9018	m <sup>6</sup> A RNA 甲基化片段富集试剂盒(qPCR 版)	48 次、24 次
A-P-9019	m <sup>6</sup> 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 <sup>6</sup> 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 <sup>6</sup> A RNA 甲基化定量检测试剂盒(比色法)	48 次、96 次
A-P-9008	m <sup>6</sup> 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、200 次
A-P-9003	RNA 甲基化修饰试剂盒	50 次、100 次
A-P-9004	高保真 cDNA 第一链合成试剂盒	20 次、40 次
A-P-9009	总体 RNA 甲基化定量检测试剂盒(荧光法)	48 次、96 次
A-P-1015	MeDIP 试剂盒	24 次、48 次
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	qPCR 快速试剂盒	100 次、200 次
A-P-1030	总体 DNA 甲基化极易定量检测试剂盒(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-1032	总体 DNA 羟甲基化定量检测试剂盒(比色法)	48 次、96 次
A-P-1003	通用组织切片 DNA 提取试剂盒	50 次、100 次
A-P-1004	血浆/血清 DNA 提取试剂盒	50 次、100 次
A-P-1006	DNA 浓缩试剂盒	50 次、100 次
A-P-1009	石蜡组织切片 DNA 提取试剂盒	50 次、100 次
A-P-1017	尿液 DNA 提取试剂盒	50 次、100 次
A-P-1038	hMeDIP 试剂盒	24 次、48 次
A-P-1052	超级 MeDIP 试剂盒	24 次、48 次
A-P-2002	细胞 ChIP 试剂盒	24 次、48 次
A-P-2003	组织 ChIP 试剂盒	24 次、48 次
A-P-2014	植物 ChIP 试剂盒	24 次、48 次
A-P-2026	一步法磁性 ChIP 试剂盒	24 次、48 次
A-P-2027	细胞&组织高敏 ChIP 试剂盒	24 次、48 次
A-P-2030	细胞&组织高敏 ChIP 测序试剂盒	12 次、24 次
A-P-1051	DNA 文库制备试剂盒(Illumina)	12 次、24 次
A-P-1053	高敏 DNA 文库制备试剂盒(Illumina)	12 次、24 次
A-P-1060	NGS12 种条码索引套装	144 次、288 次
Z5300	mRNA 纯化试剂盒	15 次、30 次
TR01	总 RNA 纯化试剂盒	50 次、150 次
TR02	植物总 RNA 纯化试剂盒	50 次、150 次



## 如何下单

1. 电话, 传真或邮件订购:

技术电话: 0313-5935521; 热线: 0313-5935520;

邮件: [1951545998@qq.com](mailto:1951545998@qq.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 米艾德院 (102206)

电话: 0313-5935521

热线: 0313-5935520

网址: [www.aderr.com](http://www.aderr.com)

Email: [1951545998@qq.com](mailto:1951545998@qq.com)