
m^6A RNA 甲基化定量检测试剂盒（比色法）

实验开始前，建议先通读说明书：

使用： m6A RNA 甲基化定量检测试剂盒（比色法） 专门为定量检测总 RNA 中 m6A 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。

RNA 输入量： 对于每次实验 RNA 的输入量是 100-300 ng。最为理想的 RNA 的输入量应该是 200 ng，正如我们所知 m6A 通常不到总 RNA 的 0.1%。

FAQ : RNA 纯度要求：A260/280 >1.9； A260/230>1.7。无 DNA 污染

起始材料（样品）： 培养的细胞，新鲜和冷冻的组织，石蜡包埋组织，血液，体液样本等等。

【基于上述起始样品提取的 RNA，才能直接用于该试剂盒】

内部对照： 这个试剂盒中包括了阳性对照和阴性对照。使用 0.02 到 1 ng 的 m6A 绘制标准曲线或可以把 m6A 作为单点阳性对照。因为不同的组织之间 m6A 的含量不一样，比如正常的和病变的样品；或处理和未处理的样品。我们建议使用二份样本（复孔，duplicate）来做，这样可以保证生成信号的可信性。这个试剂盒允许实验人员对于 m6A 进行绝对定量，或者相对定量分析。

***仅用于科学研究，不得用于临床诊断。**

试剂盒组分：

组分	48 次	96 次	保存条件 (到货后)
WB (10X Wash Buffer)	14ml	28ml	4°C
BS (Binding Solution)	5ml	10ml	室温
NC (Negative Control, 100 µg/ml)*	10ul	20ul	-20°C
PC (Positive Control, m6A 2 µg/ml)	10ul	20ul	-20°C
CA (Capture Antibody, 1000 X) *	5ul	10ul	4°C
DA (Detection Antibody, 1000 X)*	6ul	12ul	-20°C
ES (Enhancer Solution)*	5ul	10ul	-20°C
DS (Developer Solution)	5ml	10ml	4°C
SS (Stop Solution)	5ml	10ml	室温
可拆卸式 8 联管 (含框架)	6	12	4°C
使用手册 (说明书)	1	1	室温

* 在开盖使用之前，将溶液离心至管底。

注： NC(阴性对照)是一种不含 m6A 的 RNA。

PC(阳性对照)是一种含有 m6A oligos (含有 100% m6A 的)。

运输与保存：

该试剂盒分 2 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、DA 和 ES 在 -20° C 下避光保存； 2) WB、CA、DS 和 8 联管在 4° C 避光保存； 3) 剩余的组分 (BS 和 SS) 室温避光保存。

注： 在使用前检查 Wash buffer, WB, 是否有盐的沉淀物？若有，室温或 37° C 加热并晃动溶液直至溶液再次溶解，然后再使用。

* 在合适的保存情况下，所有的产品组件有效期是 6 个月，自购买之日算起。

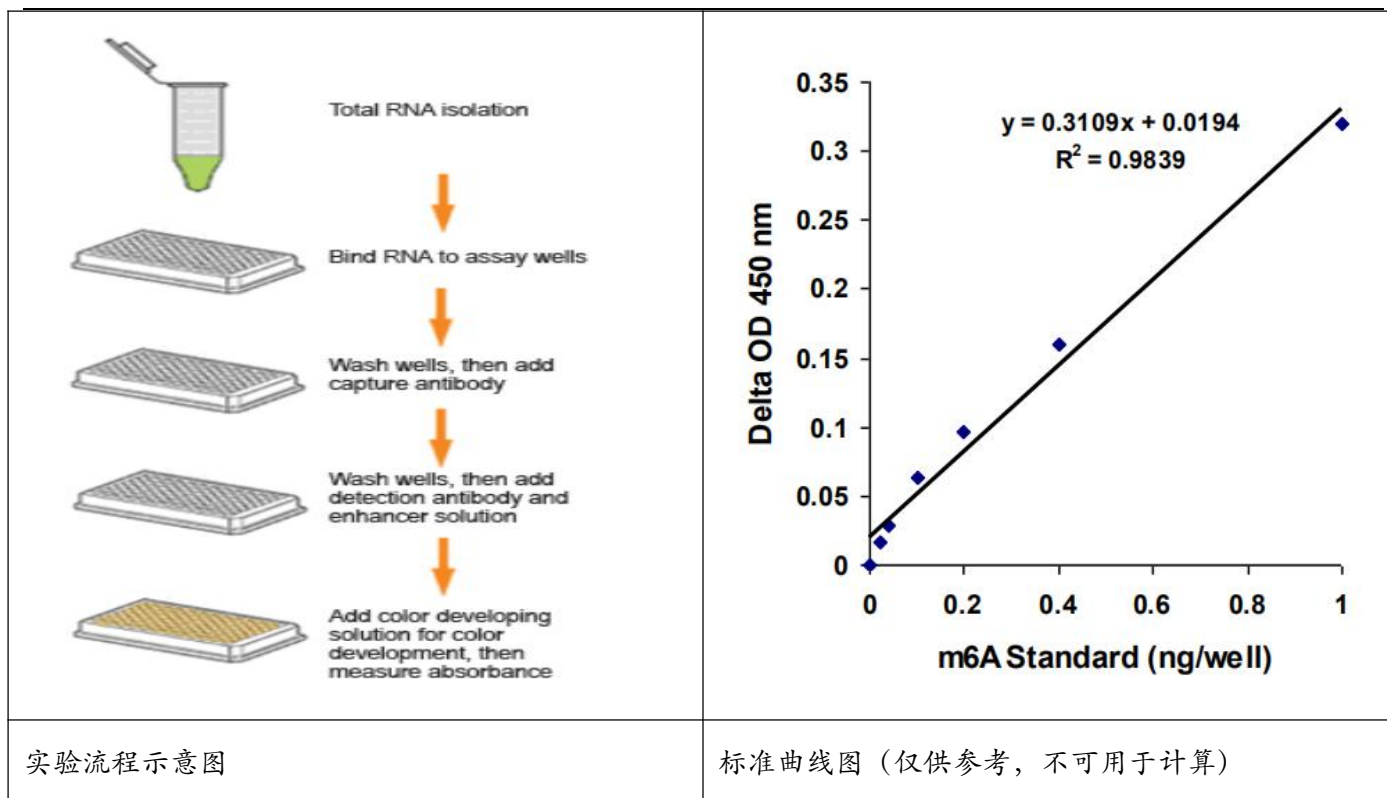
客户自备材料:

- 可调移液器
- 带滤芯枪头 (抗气溶胶) (需要灭菌处理)
- 可读取 450 nm 处的酶标仪
- 1.5 ml 离心管(需要灭菌处理)
- 37° C 恒温箱
- 封口膜 (Parafilm M) 或封板条
- 蒸馏水 (无 RNase)
- 1X TE buffer, pH7.5 - 8.0
- 已经提取好的 RNA

原理与步骤:

m6A RNA 甲基化定量检测试剂盒 (比色法) 提供了定量检测总 RNA 中 m6A 含量所需的全部必要试剂。

在这个实验中, 使用高效 RNA 结合液将总 RNA 结合在孔板上, 使用捕获和检测抗体对于 m6A 进行检测。m6A 的量与测量的 OD 值成正比。



实验步骤：（为了更好的实验结果，实验前请先阅读实验指南）

1. 起始材料：

RNA 输入量： RNA 每次反应量范围在 100 ng - 300 ng。最佳输入量是每次 200 ng。起始的 RNA 应该是在水（DEPC 水）中或缓冲液中（比如：TE）。你可以使用自己的办法来提取 RNA

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。

2. 缓冲液与溶液准备：

a. 制备 1X Wash Buffer（洗涤缓冲液）：

48 次试剂盒: 加 13 ml 的 **WB** (10X Wash Buffer) 到 117 ml 的蒸馏水 (无 RNase) (最终 pH 7.2-7.5)

96 次试剂盒: 加 26 ml 的 **WB** (10X Wash Buffer) 到 234ml 的蒸馏水 (无 RNase) (最终 pH 7.2-7.5)

* **稀释的 WB 溶液, Diluted WB** (1X Wash Buffer) , 可以在 4° C 保存 6 个月。

b. 制备**稀释的 CA** (捕获抗体) 溶液:

使用**稀释的 WB** 以 1:1000 比例稀释 **CA** (如: 加 1 ul 的 **CA** 到 1000 ul 的**稀释的 WB** 中)。

每个孔中加 50 ul 的**稀释的 CA**。

c. 制备**稀释的 DA** (检测抗体) 溶液:

使用**稀释的 WB** 以 1:2000 比例稀释 **DA** (如: 加 1 ul 的 **DA** 到 2000 ul 的**稀释的 WB** 中)。

每个孔中加 50 ul 的**稀释的 DA**。

d. 制备**稀释的 ES** (增强液) 溶液:

使用**稀释的 WB** 以 1:5000 比例稀释 **ES** (如: 加 1 ul 的 **ES** 到 5000 ul 的**稀释的 WB** 中)。

每个孔中加 50 ul 的**稀释的 ES**。

e. 制备**稀释的阳性对照 (PC)** : **【如下 2 种方法, 2 选 1 即可; 推荐标准曲线法】**

单点对照法: 使用 1X TE 稀释 **PC** (阳性对照) , 到 0.5 ng/ul (1 ul **PC** +3 ul TE) 。

建议的标准曲线法: 首先, 使用 1X TE 稀释 **PC** (阳性对照) , 到 0.5ng/ul (如: 3 ul **PC** + 9 ul 1X TE) 。使用**稀释的 WB** 以 1:2000 比例稀释 **DA** (如: 添加 1 ul 的 **DA** 到 2000 ul 的**稀释的 WB** 中) 。然后, 根据如下稀释表使用 0.5ng/ul **PC** 和 1X TE 制备 6 种不同浓度, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 和 0.5ng/ul。

管子	PC (0.5ng/ul)	1x TE	对应 PC 的浓度
1	1.0 ul	49.0 ul	0.01 ng/ul
2	1.0 ul	24.0 ul	0.02 ng/ul
3	1.0 ul	9.0 ul	0.05 ng/ul
4	1.0 ul	4.0 ul	0.1 ng/ul
5	2.0 ul	3.0 ul	0.2 ng/ul
6	4.5 ul	0 ul	0.5 ng/ul

注：以上各种稀释的溶液（除**稀释的 WB** 外）应在冰上孵育，直至使用。任何稀释的溶液，除**稀释的 WB** 外，必须当天使用，隔天需丢弃。

3. RNA 结合：

- a. 预先计算实验所需的 8 联管数量。小心的从板架上取下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. 加 80 ul 的 **BS**（结合液）到每孔中。
- c. 加 2 ul 的 **NC**，2 ul 的**稀释的 PC**（看下面的注意事项），和 200 ng 的您的样本 **RNA**（1-8 ul）到 表 1 和表 2 描述的指定的孔中 **【不同的孔】**。轻柔的从一边到另一边倾斜或者轻轻摇晃板子几次，来混合溶液。确保溶液平坦地覆盖住每个孔底。

注：① 对于单点阳性对照，加 2 ul 的 **PC**，浓度为 0.5 ng/ul（在步骤 2e 中准备的）；对于标准曲线，加 2 ul 各浓度的**稀释的 PC**，对应的浓度为 0.01 - 0.05 ng/ul（见步骤 2e 的表格）。每孔最终量应该是 **0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.4 和 1 ng**。 **【浓度*体积=质量】**

- ② 为了最佳的结合，RNA 的样本量体积不应该超过 8 ul 。
- ③ 确保 **NC**，**稀释的 PC**，和**样本 RNA** 完全加到孔中，将枪头插入 **BS** 溶液下，并吹打 1-2 次。
- d. 使用封口膜（Parafilm M）或封板条盖住实验孔板，37°C 孵育 90 分钟。

- e. 移除每个孔中的 **BS** 溶液。然后使用移液枪往每个孔中加入 150ul **稀释的 WB** 溶液洗涤，然后移除**稀释的 WB** 溶液；洗涤三次。

4. m6A RNA 捕获：

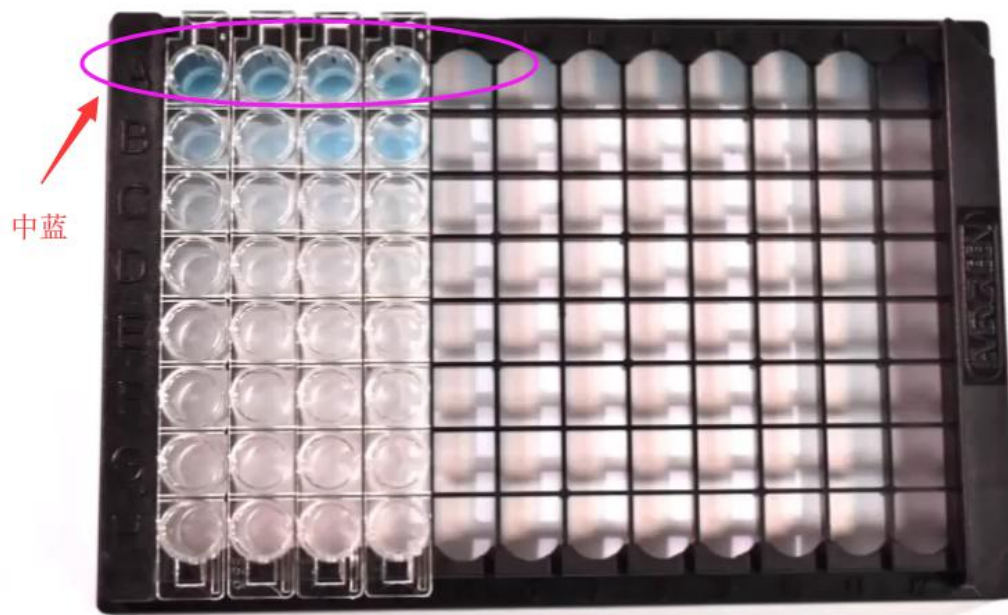
- a. 加 50 ul 的**稀释的 CA** 到每个孔中，然后覆盖并在室温下孵育 60 分钟。
- b. 使用移液枪移除每个孔中的**稀释的 CA** 溶液。

-
- c. 每个孔，加入 150 ul **稀释的 WB**，洗涤三次。
 - d. 每个孔，加入 50 ul **稀释的 DA**，然后覆盖并室温下孵育 30 分钟。
 - e. 使用移液枪移除每个孔中的**稀释的 DA** 溶液。
 - f. 每个孔，加入 150 ul **稀释的 WB**，洗涤四次。
 - g. 每个孔，加入 50 ul **稀释的 ES**，然后覆盖并室温下孵育 30 分钟。
 - h. 使用移液枪移除每个孔中的**稀释的 ES** 溶液。
 - i. 每个孔，加入 150 ul **稀释的 WB**，洗涤五次。

5. 信号检测:

- a. 每个孔，加入 100 ul 的 **DS**，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 m6A 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**（中蓝，差不多如下图）时，每个孔都加 100 ul 的 **SS** 到每孔中阻止酶反应。在加 **SS** 后，颜色将变成黄色；并在 2-15 分钟内使用酶标仪读取在 450 nm 处的吸光值。

注：如果联管板架不适合酶标仪，可转移溶液到一个标准的 96 孔板中。



6. m6A 计算:

相对定量: 分析二份不同样本 RNA 中相对 m6A RNA 甲基化状态, 采用如下的公式简单计算总 RNA 中 m6A 的百分比:

$$m^6A \% = \frac{(Sample\ OD - NC\ OD) \div S}{(PC\ OD - NC\ OD) \div P} \times 100\%$$

S 是 RNA 样本输入量, 单位为 ng。

P 是阳性对照 (PC) 输入量, 单位为 ng。

计算举例:

NC OD450 平均值是 0.1

PC OD450 平均值是 0.4

样本 OD450 平均值是 0.16

S 是 200 ng

P 是 1 ng

$$m^6A \% = \frac{(0.16 - 0.1) \div 200}{(0.4 - 0.1) \div 1} \times 100\% = 0.1\%$$

绝对定量：使用精确的公式计算 m⁶A 绝对量。首先，所有的 PC 数据都先减去背景孔 (NC) 的值，然后绘制标准曲线和 OD 值的斜率与在每个浓度点的 PC 的量。之后，使用线性回归绘制标准曲线 (Microsoft Excel 的线性回归函数适用于这样的计算)。使用线性回归中最线性的部分 (至少包含 4 个浓度点) 绘制斜率。现在，使用如下的公式计算总 RNA 中 m⁶A 的量和百分比。

$$m^6A (ng) = \frac{Sample\ OD - NC\ OD}{Slope}$$
$$m^6A \% = \frac{m^6A\ Amount (ng)}{S} \times 100\%$$

S 是 RNA 样本输入量，单位为 ng。

计算举例：

NC OD₄₅₀ 平均值是 0.10

样本 OD₄₅₀ 平均值是 0.16

斜率 是 0.3 OD/ng

S 是 200 ng

$$m^6A_{(ng)} = \frac{0.16 - 0.1}{0.3} = 0.2 \text{ ng}$$

$$m^6A_{\%} = \frac{0.2}{200} \times 100\% = 0.1\%$$

【补充说明】

除了线性拟合的方式可以用于计算结果外，某些情况下，可以其它的拟合形式（R2 越接近 1 越好）：

1. 多项式二阶回归（Polynomial Second Order Regression），如下：

$$Y = aX^2 + bX$$

2. 对数二阶回归（Logarithmic Second Order Regression），如下：

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

3. 4 参数拟合（4PL），如下：

$$y = d + \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b}$$

建议的 8 联管设置模式：

表一：我们建议在 48 次实验（在 96 次实验中，7-12 列作为样本孔）中单点的阳性对照的设置模式如下。

对照和样本一式二份（2 个复孔）。

Well#	Strip 1	Strip 2	Strip 3	Strip 4	Strip 5	Strip 6
A	NC	NC	Sample	Sample	Sample	Sample
B	PC	PC	Sample	Sample	Sample	Sample
C	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample
D	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample
E	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample
F	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample
G	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample
H	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample

表二：我们建议在 48 次实验（在 96 次实验中，7-12 列作为样本孔）中使用标准曲线的设置模式如下。

对照和样本一式二份（2 个复孔）。

Well#	Strip 1	Strip 2	Strip 3	Strip 4	Strip 5	Strip 6
A	NC	NC	Sample	Sample	Sample	Sample
B	PC 0.02 ng/well	PC 0.02 ng/well	Sample	Sample	Sample	Sample
C	PC 0.04 ng/well	PC 0.04 ng/well	Sample	Sample	Sample	Sample
D	PC 0.1 ng/well	PC 0.1 ng/well	Sample	Sample	Sample	Sample
E	PC 0.2 ng/well	PC 0.2 ng/well	Sample	Sample	Sample	Sample
F	PC 0.4 ng/well	PC 0.4 ng/well	Sample	Sample	Sample	Sample
G	PC 1 ng/well	PC 1 ng/well	Sample	Sample	Sample	Sample
H	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample

建议工作液和溶液的配制：

表三：实验所需孔的（8 联管）的数量，对应的缓冲液与溶液的需求量：

Reagents	1 well	8 wells (1 strip)	16 wells (2 strip)	48 wells (6 strip)	96 wells (12 strip)
Diluted WB	2.5 ml	20 ml	40 ml	120 ml	240 ml
BS	80 ul	640 ul	1300 ul	3900 ul	8000 ul
Diluted CA	50 ul	400 ul	800 ul	2400 ul	4800 ul
Diluted DA	50 ul	400 ul	800 ul	2400 ul	4800 ul
Diluted ES	50 ul	400 ul	800 ul	2400 ul	4800 ul
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
NC	N/A	0.5-1 ul	0.5-2 ul	1-4 ul	2-8 ul
PC	N/A	0.5-1 ul	0.5-2 ul	1-4 ul	2-8 ul

常见问题与解答

问题	可能的原因	建议的方案
阳性对照与样品孔均无信号	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。
	RNA 输入量不足	确保足够的阳性对照 (>0.2 ng) 和样本 (200 ng) 被加入到孔中。
	错误的吸光值选择	检查酶标仪是否采用恰当的波长 (450 nm) 读取。
	试剂盒没有按要求保存与操作	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。
	被样本或阳性对照所污染	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。
	过度显色	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 RNA	确保 RNA 样本是高质量的。260/280 比值应该 >1.9 且无或很少 DNA 的污染。
	加入到孔中的样本量不够	确保在第 3c 步骤中使用了足够的 RNA 量。
	样本中包含很少或无 m6A	N/A
过度的显色时间	孔没有足够的清洗干净	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	确保显色溶液或终止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 G 或从孔 1 到孔 12)。