



联系电话：13660676656

地址：广东省广州市番禺区南村镇板桥村金源路 26 号金桥大厦 310/312

## **m<sup>6</sup>A RNA 甲基化免疫印记套装试剂盒 (m<sup>6</sup>A Dot blotting 试剂盒)**

**货号：PXM6A-D10**

### **产品内容**

序号	试剂	体积	保存条件
1	洗涤缓冲液（10×）	100 ml	4℃
2	抗体稀释液	100 ml	4℃
3	封闭液 (奶粉溶于 1× 洗涤缓冲液)	奶粉 10 g	4℃
4	一抗	10 ul	-20℃
5	二抗	10 ul	-20℃
6	显影液 A	5 ml	4℃
7	显影液 B	5 ml	4℃

联系电话：13660676656



## 产品简介

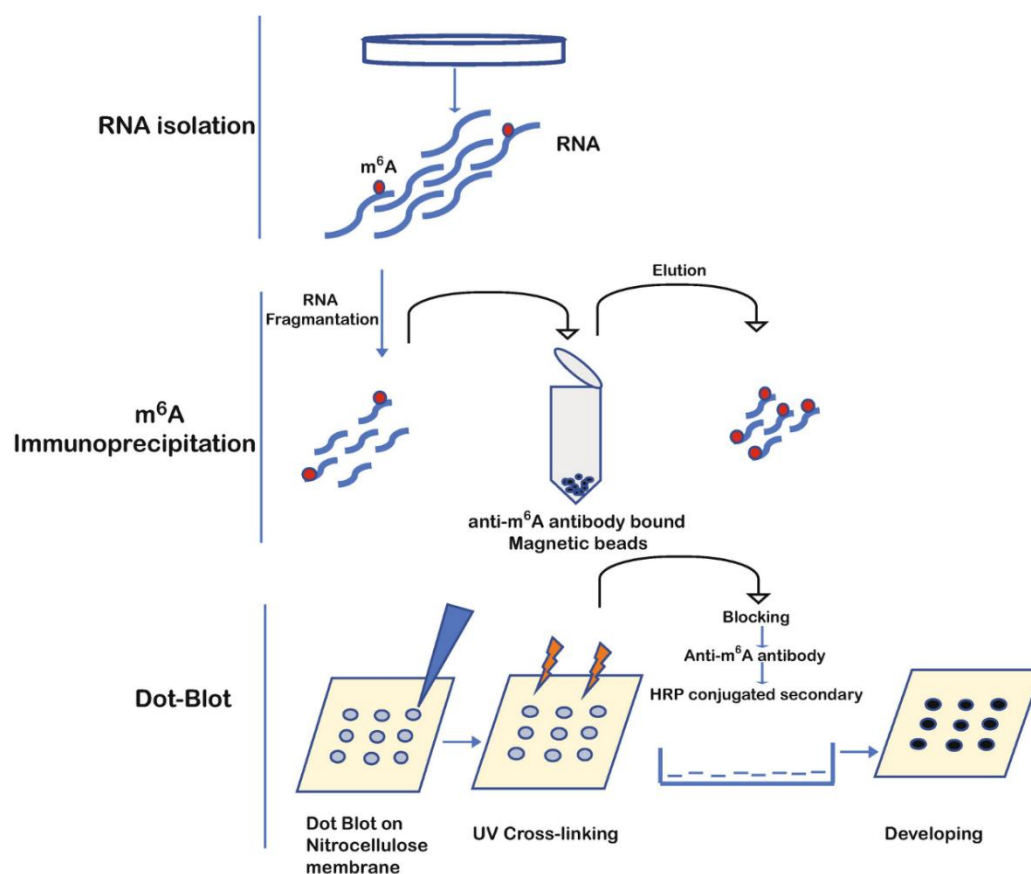
<sup>6</sup>m A 修饰是哺乳动物中最丰富的 RNA 表观修饰,同时也是第一个研究相对清楚的 RNA 表观修饰,其将表观遗传学的研究从基因组层面 (DNA 和组蛋白的修饰) 推向到 RNA 层面,是生物学中的一个重要研究前沿和研究热点。

## 产品特点

此品非常适合对各种细胞、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 和 poly A 富集的 RNA,进行 RNA 甲基化总修饰水平的定量分析。



## 操作过程



## 1. mRNA 纯化

1.1 使用 Dynabeads® mRNA 纯化试剂盒从总 RNA 中分离 mRNA。对于一次斑点印迹分析，我们建议纯化至少 20 μg 的总 RNA。

1.2 用 NanoDrop 测定纯化的 mRNA 的浓度，用 RNase-free 水将 mRNA 连续稀释至 50 ng/μl、10 ng/μl 和 2 ng/μl。



## 2. Dot blott ing:

2.1 在 95 ° C 下变性连续稀释的 mRNA，以加热 3 分钟破坏 RNA 的二级结构。

2.2 变性后立即冰浴以防止 mRNA 二级结构的重新形成。

2.3 将 2  $\mu$  l mRNA 直接滴到针对核酸转移优化的 Hybond-N+ 膜上。在

Stratalinker 2400 UV Crossl inker 中将 mRNA 与膜交联两次，使用 Autocross l ink 模式 (1,200 微焦 [x100]；25-50 秒)。

2.4 将膜放入干净的洗涤盒子中，并加入 5-10 ml 洗涤缓冲液洗涤膜， 室温下轻轻摇动 5 分钟，以洗去未结合的 mRNA。

2.5 将膜在 5-10 ml 封闭缓冲液中室温孵育 1 小时，同时轻轻摇动。

2.6 将膜与 1 ml 抗体稀释缓冲液中（抗 m6A 抗体，1:250 稀释）在 4 ° C 下轻轻摇动孵育过夜。

2.7 用 5 ml 洗涤缓冲液洗涤膜 3 次，每次 5 分钟，同时轻轻摇动。

2.8 将膜与山羊抗兔 IgG-HRP (1:10,000 稀释；20 ng/ml) 在 10 ml 抗体稀释缓冲液中室温孵育 1 小时，同时轻轻摇动。

2.9 在 10 ml 洗涤缓冲液中轻轻摇动膜，洗涤四次，每次 10 分钟。

2.10 将膜与 1 ml 显影液 (A+B 预先混合) 在黑暗中室温孵育 5 分钟。  
请注意，添加的显影液溶液的体积取决于膜的大小。建议每平方厘米膜使用 0.125 毫升显影液溶液。

联系电话：13660676656



2.11 用保鲜膜包裹膜并曝光适当的曝光时间。

2.12 冲洗胶卷（或者凝胶成像仪）。

### 注意事项：

1. 所有的耗材须用无 RNA 酶的耗材。本试剂盒的试剂均进行过去 RNA 酶处理。
2. 所有操作尽量在冰上进行，以减少 RNA 的降解。

### 参考文献：

- [1] Zaccara, S., Ries, R.J. & Jaffrey, S.R. Reading, writing and erasing mRNA methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 608 – 624 (2019).
- [2] He PC, He C. m<sup>6</sup>A RNA methylation: from mechanisms to therapeutic potential. *EMBO J.* 2021 Feb 1;40(3):e105977.
- [3] Ian A Roundtree, Guan-Zheng Luo, Zijie Zhang, Xiao Wang, Tao Zhou, Yiquang Cui, Jiahao Sha, Xingxu Huang, Laura Guerrero, Phil Xie, Emily He, Bin Shen, Chuan He (2017) YTHDC1 mediates nuclear export of N<sup>6</sup>-methyladenosine methylated mRNAs *eLife* 6:e31311.
- [4] Chen T, Hao YJ, Zhang Y, Li MM, Wang M, Han W, Wu Y, Lv Y, Hao J, Wang L, Li A, Yang Y, Jin KX, Zhao X, Li Y, Ping XL, Lai WY, Wu LG, Jiang G, Wang HL, Sang L, Wang XJ, Yang YG, Zhou Q. m<sup>(6)</sup>A RNA methylation is regulated by microRNAs and promotes reprogramming to pluripotency. *Cell Stem Cell.* 2015 Mar 5;16(3):289–301.