

AlkB (RNA/DNA去甲基化酶, Nuclease-free)

产品编号	产品名称	包装
R0639S	AlkB (RNA/DNA去甲基化酶, Nuclease-free)	200U
R0639M	AlkB (RNA/DNA去甲基化酶, Nuclease-free)	1000U
R0639L	AlkB (RNA/DNA去甲基化酶, Nuclease-free)	5000U

产品简介:

- 碧云天生产的AlkB (RNA/DNA去甲基化酶, Nuclease-free), 即AlkB (RNA/DNA demethylase, Nuclease-free)是由碧云天自主研发的PerfectProtein™技术平台通过大肠杆菌表达、纯化获得的不含DNase和RNase的高品质重组酶。AlkB是一种 α -酮戊二酸(α -Ketoglutarate, α -KG)和Fe(II)依赖的双加氧酶(Dioxygenase), 可以有效地修复单链或双链DNA和RNA中的各种烷基化损伤(Alkylation damage), 常被用于去除RNA中的 m^6A 等甲基化修饰, 去除DNA中的 m^1A 、 m^3C 、 m^6A 等修饰, 并进一步用于后续的qPCR或高通量测序分析[1-5]。
- N^6 -Methyladenosine (m^6A)是真核生物中一种最普遍和丰富的RNA转录后修饰, 存在于各类真核或病毒RNA, 包括mRNA、rRNA、tRNA、snRNA、microRNA (miRNA)和长链非编码RNA (Long non-coding RNA, lncRNA)中, 这种修饰被认为占据了超过80%的RNA甲基化修饰[4]。mRNA转录物中 m^6A 的丰度会影响RNA的多种代谢过程, 例如剪接(Splicing)、出核(Nuclear export)、翻译的能力及稳定性以及RNA转录[6]。
- AlkB可以在体外以 α -酮戊二酸和Fe(II)依赖的方式催化RNA的 m^6A 去甲基化, 通过生成6-羟甲基衍生物($HO-m^6A$)并进一步转化为腺嘌呤(Adenine) [1]。
- AlkB是细菌暴露于甲基化试剂环境时产生的一种适应性应激反应蛋白, 不仅可以修复RNA的甲基化损伤, 还可以修复DNA的甲基化损伤[2,3]。AlkB催化DNA中1-甲基腺嘌呤(m^1A)和3-甲基胞嘧啶(m^3C)的去甲基化需要 O_2 、 Fe^{2+} 和 α -酮戊二酸的参与; AlkB在催化DNA去甲基化修饰的同时, 将 α -酮戊二酸转化为琥珀酸和 CO_2 , 并生成不稳定的羟甲基, 被羟甲基化的甲基再以甲醛的形式释放[1-3]。单链DNA (ssDNA)比双链DNA (dsDNA)中的腺嘌呤的N1和胞嘧啶的N3更容易受到甲基化影响, 因此, 相比dsDNA, AlkB对ssDNA中的损伤修复更为高效[1-3]。
- 在RNA高通量测序建库的过程中, RNA中被修饰的核苷酸会对反转录造成干扰, 导致转录终止或转录错误。因此, 在反转录之前, 利用AlkB对可能含有1-甲基腺嘌呤(m^1A)、3-甲基胞嘧啶(m^3C)或1-甲基鸟嘌呤(m^1G)的RNA进行去甲基化处理, 再进行高通量测序, 这一方法被称为AlkB-facilitated RNA methylation sequencing (ARM-Seq), 可有效提高甲基化修饰RNA测序的灵敏度和特异性, 揭示更多未被发现的小RNA [4]。PANDORA-seq也是一种使用的AlkB处理RNA以发现更多未知小RNA的高通量测序方法[5]。
- 碧云天生产的AlkB不含RNase, 可以更好地用于去甲基化修饰及后续建库和高通量测序。文献中, 例如PANDORA-seq技术方法中指出, 该论文使用的表达纯化的AlkB中由于含有RNase, 而会对RNA的高通量测序带来负面影响[5]。
- 碧云天生产的AlkB去除HEK 293T细胞总RNA的 m^6A 甲基化修饰的效果请参考图1。

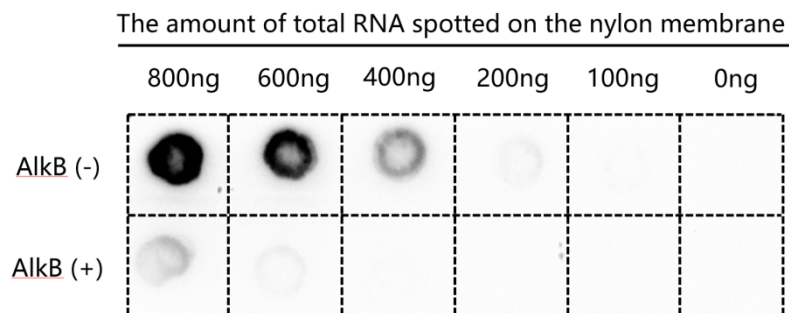


图1. 碧云天生产的AlkB对HEK 293T细胞总RNA的 m^6A 修饰的去甲基化效果图。在20 μ l反应体系中, 加入不同量的HEK 293T总RNA (4 μ g、3 μ g、2 μ g、1 μ g、0.5 μ g、0 μ g)以及4U的AlkB, 37 $^{\circ}C$ 孵育100min; 孵育结束后, 取4 μ l反应产物滴至尼龙膜上(分别为800、600、400、200和100ng), 待样品风干后, 进行紫外交联, 然后用Wash Buffer (0.1% Tween-20 in 1X PBS)洗涤3min, 洗去未结合至膜上的RNA, 再用Blocking Buffer (5% Non-fat milk in Wash Buffer)室温封闭1h, 之后将膜转移至 N^6 -Methyladenosine (m^6A) Rabbit Polyclonal Antibody (AF7407)中, 室温孵育2h (或4 $^{\circ}C$ 孵育过夜)。孵育结束后用Wash Buffer室温洗涤4次, 每次5min; 随后将洗涤过的尼龙膜浸泡在适当稀释的辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L) (A0208) 溶液中, 室温孵育1h。然后用Wash Buffer室温洗涤4次, 每次5min; 最后用BeyoECL Star (特超敏ECL化学发光试剂盒) (P0018A)进行化学发光, 并使用BeyoImager™ 600化学发光成像系统记录化学发光效果。如图所示, 本产品对HEK 293T细

胞总RNA的m⁶A去甲基化效果显著。实验结果显示，4μg的HEK 293T细胞总RNA用4U碧云天的AlkB蛋白37°C孵育处理100min后，可以充分去除其中的m⁶A甲基化。图中的检测效果仅供参考，不同的实验条件获得的检测效果可能会略有不同。

- **用途：**RNA的m⁶A、m¹A、m³C或m¹G去甲基化；ARM-seq、PANDORA-seq等；DNA的m¹A、m³C和m⁶A的去甲基化。
- **酶活性定义：**在本产品的20μl反应体系中，可以把1μg HEK 293T细胞总RNA的m⁶A修饰去除约90-100%的AlkB的酶量定义为1个活性单位。在AlkB酶活性保持较好的情况下，1μg AlkB的酶活性大约为1U。
- **来源：**大肠杆菌表达的重组蛋白。
- **纯度：**不含DNA内切酶和外切酶，不含RNA酶，不含磷酸酯酶。
- **酶储存溶液：**200mM NaCl, 2mM DTT, 50% (v/v) Glycerol, 20mM Tris-HCl (pH8.0)。
- **失活或抑制：**加入与反应体系等体积的含11mM EDTA和200mM乙酸钠的缓冲液可终止反应，或酚氯仿抽提。
- 一个200U、1000U和5000U包装的本产品，可以大约处理200个、1000个和5000个约1μg的RNA样品。如果希望反应更加充分，加入的酶量需要适当加大，可以处理的样品数量会相应减少。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
R0639S-1	AlkB (20U/μl)	10μl
R0639S-2	AlkB Buffer I (10X)	100μl
R0639S-3	AlkB Buffer II (10X)	100μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
R0639M-1	AlkB (20U/μl)	50μl
R0639M-2	AlkB Buffer I (10X)	500μl
R0639M-3	AlkB Buffer II (10X)	500μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
R0639L-1	AlkB (20U/μl)	250μl
R0639L-2	AlkB Buffer I (10X)	1.25ml×2
R0639L-3	AlkB Buffer II (10X)	1.25ml×2
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，至少一年有效。

注意事项：

- 使用时宜放在冰盒内或冰浴上，使用完毕后宜立即放置于-20°C保存。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. AlkB对total RNA的N⁶-methyladenine (m⁶A)修饰的去甲基化反应：

a. AlkB的去甲基化反应。

参考下表在冰浴中配制如下反应体系。

Reagent	Volume	Final Concentration
Nuclease-Free Water	(14-x-y)μl	-
Total RNA (0.05-4μg/μl)	xμl	0.01-1μg/μl
AlkB Buffer I (10X)	2μl	1X
AlkB Buffer II (10X)	2μl	1X
RNase Inhibitor (40U/μl)	2μl	2U/μl
AlkB (20U/μl)	yμl	0.01-1U/μl
Total Volume	20μl	-

注1：按上表设置好反应体系后，轻轻混匀(可以用移液器吹打混匀或用Vortex在最低速度轻轻混匀)，随后低速离心沉淀液体。RNA和AlkB用量的微克数保持相同即可。AlkB用量很少时，可以取适量先使用Reaction Buffer (1X)进行稀释。如果希望去甲基化程度更加充分，AlkB的用量可以适当加大一些。

注2：由于涉及RNA操作，需要严格按照RNA操作的规范进行，避免RNase污染，相关试剂和耗材需要经过DEPC处理去除RNase或者确保是RNase free的。

- b. 反应条件：37°C孵育100min。说明：为避免环境中RNase污染导致的样品RNA降解，可以考虑适当加大AlkB的用量并适当缩短孵育时间。
- c. 终止反应：加入与反应体系等体积的含11mM EDTA和200mM乙酸铵的缓冲液可终止反应，或进行酚氯仿抽提。
2. 其它用途可以参考上述用途或适当的文献资料进行。

参考文献：

1. Fedeles BI, Singh V, Delaney JC, Li D, Essigmann JM. J Biol Chem. 2015 Aug 21;290(34):20734-20742.
2. Trewick SC, Henshaw TF, Hausinger RP, Lindahl T, Sedgwick B. Nature. 2002 Sep 12;419(6903):174-8.
3. Ougland R, Zhang CM, Liiv A, Johansen RF, Seeberg E, Hou YM, Remme J, Falnes PØ. Mol Cell. 2004 Oct 8;16(1):107-16.
4. Cozen AE, Quartley E, Holmes AD, Hrabeta-Robinson E, Phizicky EM, Lowe TM. Nat Methods. 2015 Sep;12(9):879-84.
5. Shi J, Zhang Y, Tan D, et al. Nat Cell Biol. 2021 Apr;23(4):424-436.
6. Jonkhout N, Tran J, Smith MA, Schonrock N, Mattick JS, Novoa EM. RNA. 2017 Dec;23(12):1754-1769.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
R0021	DEPC水	100ml
R0022	DEPC水	500ml
ST1249-2ml	DEPC (≥97%, Reagent grade)	2ml
ST1249-10ml	DEPC (≥97%, Reagent grade)	10ml
ST036	DEPC	10g
ST476	PBS (10X)	500ml
AF7407	N ⁶ -Methyladenosine (m ⁶ A) Rabbit Polyclonal Antibody	50μl
A0208	辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)	1ml
P0018AS	BeyoECL Star (特超敏ECL化学发光试剂盒)	100ml
P0018AM	BeyoECL Star (特超敏ECL化学发光试剂盒)	500ml
FFN13	尼龙膜(带正电荷, 进口分装, 15×16.5cm, 0.45μm)	5张/包装
FFN10	尼龙膜(带正电荷, 进口分装, 7.5×8.25cm, 0.45μm)	20张/包装
FFN11	尼龙膜(带正电荷, 进口分装, 7.5×8.25cm, 0.45μm)	100张/包装
FFN15	尼龙膜(带正电荷, 进口原装, 30cm×3.3m/卷, 0.45μm)	1卷/包装

Version 2022.04.29