



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology  
 订货热线: 400-1683301或800-8283301  
 订货e-mail: order@beyotime.com  
 技术咨询: info@beyotime.com  
 网址: http://www.beyotime.com

## AlkB (D135S/L118V) (RNA m<sub>2</sub><sup>2</sup>G去甲基化酶, Nuclease-free)

产品编号	产品名称	包装
R0643S	AlkB (D135S/L118V) (RNA m <sub>2</sub> <sup>2</sup> G去甲基化酶, Nuclease-free)	50U
R0643M	AlkB (D135S/L118V) (RNA m <sub>2</sub> <sup>2</sup> G去甲基化酶, Nuclease-free)	250U
R0643L	AlkB (D135S/L118V) (RNA m <sub>2</sub> <sup>2</sup> G去甲基化酶, Nuclease-free)	1250U

### 产品简介:

- 碧云天生产的AlkB (D135S/L118V) (RNA m<sub>2</sub><sup>2</sup>G去甲基化酶, Nuclease-free), 即AlkB (D135S/L118V) (RNA m<sub>2</sub><sup>2</sup>G 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<sup>6</sup>A等甲基化修饰, 去除DNA中的m<sup>1</sup>A、m<sup>3</sup>C、m<sup>6</sup>A等修饰, 并进一步用于后续的qPCR或高通量测序分析[1-5]。
- AlkB (D135S/L118V) (RNA m<sub>2</sub><sup>2</sup>G去甲基化酶, Nuclease-free)是在AlkB (RNA/DNA去甲基化酶, Nuclease-free) (R0639)的基础上进行突变, 将AlkB第135位天冬氨酸(Asp, D)突变为丝氨酸(Ser, S)并将第118位亮氨酸(Leu, L)突变为缬氨酸(Val, V)的突变体。AlkB (D135S/L118V)比野生型AlkB能更有效地去除转运RNA (tRNA)中的N<sup>2</sup>,N<sup>2</sup>-dimethylguanosine (m<sub>2</sub><sup>2</sup>G)甲基化修饰, 并可进一步用于后续的qPCR或高通量测序分析[6]。m<sup>2</sup>G对Watson-Crick碱基配对几乎没有影响, 而m<sub>2</sub><sup>2</sup>G与m<sup>1</sup>A、m<sup>1</sup>G、m<sup>3</sup>C一样, 是一种不利于碱基配对的修饰, 在反转录过程中会导致终止或突变[6,7], 而去除m<sub>2</sub><sup>2</sup>G的一个甲基变成N<sup>2</sup>-methylguanosine (m<sup>2</sup>G)就可以通过适当的耐逆转录酶高效转录成cDNA用于后续的qPCR或高通量测序。
- N<sup>2</sup>,N<sup>2</sup>-dimethylguanosine (m<sub>2</sub><sup>2</sup>G)是一种特征性核苷, 在外环胺上有两个甲基, 存在于超过80%的真核物种tRNA中, 其位于tRNA的二氢尿苷茎和反密码子茎之间弯曲处的第26号鸟苷(G26)。m<sup>2</sup>G和m<sub>2</sub><sup>2</sup>G是细胞RNA上常见的修饰[7,8]。
- tRNA是细胞中被修饰最广泛的RNA家族, tRNA的修饰对细胞生理学具有重要意义。例如tRNA反密码子环中的修饰对于微调mRNA翻译至关重要, 而反密码子环外的修饰在tRNA稳定性、折叠、定位和质量控制中发挥作用[8]。然而在tRNA或tsRNA (tRNA-derived small RNA)反转录时, m<sup>1</sup>A、m<sup>1</sup>G、m<sup>3</sup>C和m<sub>2</sub><sup>2</sup>G等甲基化修饰会削弱或阻碍cDNA合成[9,10], 同时这些转录后修饰和稳定的二级结构也会干扰与接头的连接, 只有有效去除这些甲基化修饰才能消除修饰对于反转录和连接反应的负面效应, 减小二级结构的干扰, 获得更好的接头连接效果和更好的反转录效果。
- 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<sup>1</sup>A)、1-甲基鸟嘌呤(m<sup>1</sup>G)或3-甲基胞嘧啶(m<sup>3</sup>C)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、DAMM-seq、DM-TGIRT-seq、CPA-seq等都使用了AlkB或其突变体进行了去甲基化处理, 实现了对于tRNA或tsRNA等存在m<sup>1</sup>A、m<sup>3</sup>C、m<sup>6</sup>A、m<sup>1</sup>G和m<sub>2</sub><sup>2</sup>G等甲基化修饰RNA的准确高效的高通量测序[5,11-13]。
- 为了获得最佳的存在甲基化修饰的RNA的测序效果, 推荐AlkB (RNA/DNA去甲基化酶, Nuclease-free) (R0639)与AlkB (D135S) (RNA m<sup>1</sup>G去甲基化酶, Nuclease-free) (R0641)和AlkB (D135S/L118V) (RNA m<sub>2</sub><sup>2</sup>G去甲基化酶, Nuclease-free) (R0643)共同使用, 同时去除RNA的多种甲基化修饰, 包括m<sup>1</sup>A、m<sup>3</sup>C、m<sup>6</sup>A、m<sup>1</sup>G和m<sub>2</sub><sup>2</sup>G等[6,10,11,14]。
- 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[5]。
- **RNase/DNase活性检测:** 将本产品与RNA或DNA于37°C孵育100分钟未检测到明显的RNase/DNase活性。
- **用途:** tRNA的m<sub>2</sub><sup>2</sup>G去甲基化; DAMM-Seq、ARM Seq、PANDORA-seq以及DM-TGIRT-seq、CPA-seq等。
- **酶活性定义:** 在100μl反应体系中, 可以把1nmol tRNA的m<sub>2</sub><sup>2</sup>G修饰基本去除生成m<sup>2</sup>G的AlkB (D135S/L118V)的酶量定义为1个活性单位。在AlkB (D135S/L118V)酶活性保持较好的情况下, 4μg AlkB (D135S/L118V)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5mM EDTA可终止反应, 或酚氯仿抽提。
- 一个50U、250U和1250U包装的本产品, 可以大约处理50个、250个和1250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
------	------	----

R0643S-1	AlkB (D135S/L118V) (5U/μl)	10μl
R0643S-2	AlkB Buffer I (10X)	100μl
R0643S-3	AlkB Buffer II (10X)	100μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
R0643M-1	AlkB (D135S/L118V) (5U/μl)	50μl
R0643M-2	AlkB Buffer I (10X)	500μl
R0643M-3	AlkB Buffer II (10X)	500μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
R0643L-1	AlkB (D135S/L118V) (5U/μl)	250μl
R0643L-2	AlkB Buffer I (10X)	2.5ml
R0643L-3	AlkB Buffer II (10X)	2.5ml
—	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 (RNA/DNA去甲基化酶, Nuclease-free) (R0639)与AlkB (D135S) (RNA m<sup>1</sup>G去甲基化酶, Nuclease-free) (R0641)和AlkB (D135S/L118V) (RNA m<sub>2</sub><sup>2</sup>G去甲基化酶, Nuclease-free) (R0643)共同使用，同时去除RNA的多种甲基化修饰(m<sup>1</sup>A、m<sup>3</sup>C、m<sup>6</sup>A、m<sup>1</sup>G和m<sub>2</sub><sup>2</sup>G等)。

a. 参考下表在冰浴中配制如下反应体系。

Reagent	Volume	Final Concentration
Nuclease-Free Water	(15-x-3y)μl	-
RNA	xμl (≤0.2μg)	≤0.01μg/μl
AlkB Buffer I (10X)	2μl	1X
AlkB Buffer II (10X)	2μl	1X
RNase Inhibitor (40U/μl)	1μl	2U/μl
AlkB (20U/μl)	yμl (≤0.2μl)	≤0.2U/μl
AlkB (D135S) (5U/μl)	yμl (≤0.2μl)	≤0.05U/μl
AlkB (D135S/L118V) (5U/μl)	yμl (≤0.2μl)	≤0.05U/μl
Total Volume	20μl	-

注1：按上表配制好反应体系后，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。如果希望去甲基化程度更加充分，AlkB、AlkB (D135S)和AlkB (D135S/L118V)的用量可以适当增加。

注2：不同的RNA样品甲基化程度的差异可能会比较大，可以根据具体的样品和去甲基化的效果，适当调整酶的用量。例如，用于tRNA或tsRNA这样修饰程度非常高的样品，酶的用量宜适当加大。

注3：由于涉及RNA操作，须严格按照RNA的操作规范进行，避免RNase污染，相关试剂和耗材须经过DEPC处理去除RNase或者确保是RNase free的。

b. 反应条件：25°C孵育30分钟。

注：可以根据实际的去甲基化效果，适当延长孵育时间。

c. 后续可以采用苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提及乙醇沉淀等适当方法纯化后，即可用于后续RNA高通量测序建库或其它适当的后续分析检测。

2. AlkB (D135S/L118V) (RNA m<sub>2</sub><sup>2</sup>G去甲基化酶)对tRNA的N<sup>2</sup>,N<sup>2</sup>-dimethylguanosine (m<sub>2</sub><sup>2</sup>G)修饰的去甲基化反应。

a. 参考下表在冰浴中配制如下反应体系。

Reagent	Volume	Final Concentration
Nuclease-Free Water	(15-x-y)μl	-
RNA	xμl (≤0.2μg)	≤0.01μg/μl

AlkB Buffer I (10X)	2µl	1X
AlkB Buffer II (10X)	2µl	1X
RNase Inhibitor (40U/µl)	1µl	2U/µl
AlkB (D135S/L118V) (5U/µl)	yµl (≤0.2µl)	≤0.05U/µl
Total Volume	20µl	-

**注1:** 按上表配制好反应体系后, 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。如果希望去甲基化程度更加充分, AlkB (D135S/L118V)的用量可以适当增加。

**注2:** 不同的RNA样品甲基化程度的差异可能会比较大, 可以根据具体的样品和去甲基化的效果, 适当调整酶的用量。例如, 用于tRNA或tsRNA这样修饰程度非常高的样品, 酶的用量宜适当加大。

**注3:** 由于涉及RNA操作, 须严格按照RNA的操作规范进行, 避免RNase污染, 相关试剂和耗材须经过DEPC处理去除RNase或者确保是RNase free的。

b. 反应条件: 25°C孵育120分钟。

**注:** 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 (D135S/L118V)的用量并适当缩短孵育时间。

c. 终止反应: 加入5mM EDTA可终止反应, 或进行酚氯仿抽提。

3. 其它用途可以参考适当的文献资料进行, 或者根据具体的实验目的, 通过实验进行摸索和优化。

### 参考文献:

1. Fedeles BI, Singh V, Delaney JC, Li D, Essigmann JM. J Biol Chem. 2015. 290(34):20734-20742.
2. Trewick SC, Henshaw TF, Hausinger RP, Lindahl T, Sedgwick B. Nature. 2002. 419(6903):174-8.
3. Ougland R, Zhang CM, Liiv A, Johansen RF, Seeberg E, et al. Mol Cell. 2004. 16(1):107-16.
4. Cozen AE, Quartley E, Holmes AD, Hrabeta-Robinson E, Phizicky EM, et al. Nat Methods. 2015. 12(9):879-84.
5. Shi J, Zhang Y, Tan D, Zhang X, Yan M, et al. Nat Cell Biol. 2021. 23(4):424-436.
6. Dai Q, Zheng G, Schwartz MH, Clark WC, Pan T. Angew Chem Int Ed Engl. 2017. 56(18):5017-5020.
7. Zhang W, Foo M, Eren AM, Pan T. Mol Cell. 2022. 82(5):891-906.
8. Edqvist J, Grosjean H, Stråby KB. Nucleic Acids Res. 1992. 20(24):6575-81.
9. Pang YL, Abo R, Levine SS, Dedon PC. Nucleic Acids Res. 2014. 42(22):e170.
10. Zheng G, Qin Y, Clark WC, Dai Q, Yi C, et al. Nat Methods. 2015. 12(9):835-837.
11. Zhang LS, Ju CW, Jiang B, He C. Methods Enzymol. 2023. 692:39-54.
12. Padhiar NH, Katneni U, Komar AA, Motorin Y, Kimchi-Sarfaty C. Trends Genet. 2024. 40(3):276-290.
13. Wang H, Huang R, Li L, Zhu J, Li Z, et al. Cell Discov. 2021. 7(1):25.
14. Bao Z, Li T, Liu J. Molecules. 2023. 28(4):1517.

### 相关产品:

产品编号	产品名称	包装
R0101	RNase Inhibitor, Murine	2kU/10kU/50kU/200kU
R0102	RNase Inhibitor	2kU/10kU/50kU
R0105	RNase Inhibitor Plus, Human Placenta	2kU/10kU/50kU/200kU
R0106	RNase Inhibitor, Human Placenta	2kU/10kU/50kU/200kU
R0639	AlkB (RNA/DNA去甲基化酶, Nuclease-free)	200U/1000U/5000U
R0641	AlkB (D135S) (RNA m <sup>1</sup> G去甲基化酶, Nuclease-free)	200U/1000U/5000U
R0643	AlkB (D135S/L118V) (RNA m <sup>2</sup> G去甲基化酶, Nuclease-free)	200U/1000U/5000U
ST043	DTT	1g/5g/25g/100g
ST761	Tris (Molecular Biology Grade)	100g/500g/2.5kg
ST876	BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)	100ml/500ml
ST1303	EDTA (≥99%, BioPremium)	50g/250g/1kg
ST1353	甘油(99%, Reagent grade)	100ml/500ml/6×500ml
ST1641	氯化钠(≥99.0%, BioReagent)	1kg

Version 2024.10.05