

说明书

F2-RNA pull-down 试剂盒（动物）

产品信息

货号	产品名称	规格
FI8701-12T	F2-RNA pull-down 试剂盒（动物）	12 次
FI8701-24T	F2-RNA pull-down 试剂盒（动物）	24 次
FI8701-40T	F2-RNA pull-down 试剂盒（动物）	40 次

产品描述

辉骏生物自主研发的 F2-RNA pull-down 试剂盒（已获得国家知识产权局发明专利授权），利用一段只有 16nt 的 RNA 标签“F2”标记 RNA，之后采用特异性配体磁珠，高效调取样本中的目标 F2-RNA 及其结合蛋白。F2 标签是短 RNA 序列，与目标 RNA 连接后，几乎不影响其结构和功能，可以用于标记各种类型的 RNA。

试剂盒组分

编号	名称	12T 规格	24T 规格	40T 规格	储存条件
①	磁珠	500 μ L	1 mL	1.7 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
②	裂解缓冲液	7 mL	14 mL	22 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
③	NT2 缓冲液	32 mL	64 mL	105 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
④	RNA 结构缓冲液	650 μ L	1.3 mL	2.2 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
⑤	漂洗液	32 mL	64 mL	105 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
⑥	洗脱缓冲液	650 μ L	1.3 mL	2.2 mL	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑦	蛋白酶抑制剂	230 μ L	460 μ L	760 μ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑧	RNase 抑制剂	65 μ L	130 μ L	220 μ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑨	F2 配体	250 μ L	500 μ L	840 μ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑩	10 mL 离心管	1 个	1 个	1 个	—

***注意：**该试剂盒包含足够完成 12、24 或 40 个反应的试剂，每个反应使用 40 μ L 磁珠。由于每次 pull-down 实验至少需要设置一个实验组和一个阴性对照组，因此一次实验至少需要使用 2 个反应的试剂量。

额外所需材料

1. 自备材料: T7 体外转录试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒 (体外 F2-RNA pull-down)、RNA-F2 过表达细胞 (体内 F2-RNA pull-down)、PBS、RNase-free 水。
2. 所需仪器: 磁力架 (辉骏产品货号 FI7101)、混匀仪、低温离心机、超声波破碎仪。

使用说明

I 注意事项

1. 请勿干燥或剧烈涡旋磁珠, 禁止长时间置于磁场, 这些操作可能会引起磁珠聚团, 降低结合活性。
2. 为保证磁珠均匀分布, 请通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀瓶中磁珠。
3. 请务必使用无 RNase 的实验材料: 如离心管、枪头等。
4. 本试剂盒可以用于体内或体外 RNA pull-down 实验, 请根据实验要求选择相应的操作方法。
5. 具体样品量和孵育时间依赖于每个特定体系, 可能需要优化才能得到最大产量。
6. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

II 实验前准备工作

方案 1: 体外 F2-RNA pull-down 实验——RNA 探针制备

- (1) 根据目标 RNA 序列设计带有 T7 启动子 (TAATACGACTCACTATAGGG) 和 F2 标签序列 (GGCGCTGACAAAGCGCC) 的引物, 以目标序列的 DNA 质粒为模板, PCR 分别获得 T7-正义 RNA-F2 (实验组) 和 T7-反义 RNA-F2 (对照组) 转录模板, 按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明书回收目标 DNA:

引物名称	引物序列
正义链-正引物 (带 T7 启动子)	5'- TAATACGACTCACTATAGGG+目标 RNA 头部序列 -3'
正义链-反引物 (带 F2 标签)	5'- GGCGCTTTGTCAGCGCC+目标 RNA 尾部序列的反向互作序列 -3'
反义链-正引物 (带 F2 标签)	5'- GGCGCTTTGTCAGCGCC+目标 RNA 头部序列 -3'
反义链-反引物 (带 T7 启动子)	5'- TAATACGACTCACTATAGGG+目标 RNA 尾部序列的反向互作序列 -3'

- (2) 以上述 DNA 为模板, 按照自备的 RNA 体外转录试剂盒说明书配置反应体系, 以下为示例 (该体系和步骤可能因转录试剂盒的不同而有所差别, 请务必根据试剂盒说明书操作):

组分	用量
10*Reaction Buffer	2 μ L
ATP/ GTP/ UTP/ CTP	各 2 μ L
DNA 模板	0.5 μ g
T7 RNA Polymerase Enzyme Mix	2 μ L
RNase-free H ₂ O	Up to 20 μ L

37°C 孵育 2 h, 之后加入 1 μ L DNase I, 37°C 孵育 15min 将 DNA 模板消化, 得到正义和反义 RNA:

(3) 取 2 μL RNA 检测浓度；取 1~2 μL RNA 进行 2%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量和长度；符合要求的 RNA 置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存或直接用于后续实验。

* 注意：i. 由于 RNA 容易降解，最好在 RNA pull-down 实验当天或前一天进行体外转录实验。

ii. 当目标序列过短 (<300bp) 或过长 (>4kb) 时，探针制备难度将增加；长序列可以分段进行实验；短序列也可以选择体内 F2-RNA pull-down 方案。

方案 2：体内 F2-RNA pull-down——RNA-F2 过表达细胞制备

(1) 根据目标 RNA 序列设计带 F2 标签序列 (GGCGCTGACAAAGCGCC) 的引物，扩增得到“F2-目标序列”，并构建至表达载体中；

(2) 表达载体转染目的细胞，细胞内会天然转录得到带 F2 标签的目标 RNA (对照用空载体表达细胞)；

(3) qPCR 检测 RNA-F2 的表达情况。

III 操作方法

1. 总蛋白提取

1.1 动物细胞

(1) 实验组和对照组各取 $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ 个细胞，用预冷的 PBS (RNase-free) 清洗细胞 2~3 次，每次 4 $^{\circ}\text{C}$ 500 g 离心 5 min 收集细胞沉淀，彻底去除培养基成分；

(2) 每组加入 300~500 μL 预冷的②裂解缓冲液、3~5 μL ⑦蛋白酶抑制剂 (按 1%添加) 和 1.5~2.5 μL ⑧RNA 酶抑制剂 (按 0.5%添加)，吹打混匀；

(3) 为了更充分裂解，最好冰上超声至溶液基本澄清，若无超声条件，也可以置于冰上裂解 30 min，间隔手动混匀；

(4) 4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的无 RNase 离心管中，取 30 μL 作为 input，剩余用于 RNA pull down 实验，-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2 动物组织

(1) 采用预冷的 PBS (RNase-free) 清洗新鲜组织 2~3 次，彻底去除血液等成分；如果样本为冷冻组织，在取样时也需要进行清洗操作；

(2) 实验组和对照组各取 0.1~0.2 g 干净组织，用液氮在研钵中充分研磨，转移粉末至新的无 RNase 离心管中；

(3) 每组加入 300~500 μL 预冷的②裂解缓冲液、3~5 μL ⑦蛋白酶抑制剂 (按 1%添加) 和 1.5~2.5 μL ⑧RNA 酶抑制剂 (按 0.5%添加)，吹打混匀；

(4) 冰上超声破碎至溶液基本澄清；

(5) 4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的无 RNase 离心管中，取 30 μL 作为 input，剩余用于 RNA pull down 实验，-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

* 注意：i. 体外 RNA pull-down 的实验组和对照组所用样本一样，可以先一起裂解，取完 input 后再平分为两管。

ii. 当样本不能完全裂解时 (溶液很浑浊)，可以增加裂解缓冲液或改善超声条件继续裂解。超声条件因样本类型

和超声设备而异，应提前摸索好合适的条件。根据经验，样本蛋白浓度通常不低于 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，总量约 2~3 mg。

iii. 如果样本中目标蛋白丰度较低，或结合物间的结合较弱，可以增加初始样本量，同时等比例增加裂解缓冲液和酶抑制剂的用量，但总孵育体积最大不超过离心管体积的 2/3，体积过大可以更换大规格离心管。

2. F2 配体磁珠制备

- (1) 将①磁珠上下颠倒混匀，取实验组和对照组一共所需的 80 μL 磁珠到新的无 RNase 离心管中；
- (2) 加入 1 mL ③NT2 缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (3) 重复上步操作一次；
- (4) 加入 400 μL ③NT2 缓冲液，上下颠倒重悬磁珠；
- (5) 加入 40 μL ⑨F2 配体，混匀仪上室温孵育 30 min；
- (6) 放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (7) 加入 1 mL ③NT2 缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (8) 重复上步操作一次；
- (9) 加入 600 μL ③NT2 缓冲液，上下颠倒重悬磁珠，将磁珠平分为两份，每组各约 300 μL ，转移到新的无 RNase 离心管中，记为实验组和对照组。

3. 漂洗液准备

为了防止实验过程中的蛋白和 RNA 降解，需要向漂洗液中添加蛋白酶抑制剂和 RNase 抑制剂。取出⑩10 mL 离心管，按照下表所示，加入实验组和对照组总共所需的⑤漂洗液、⑦蛋白酶抑制剂（按 0.5%添加）和⑧RNase 抑制剂（按 0.05%添加），混合均匀，冰上保存，现配现用。如果有多组样本，请按照实际使用量配置。

实验类型	⑤漂洗液	⑦蛋白酶抑制剂	⑧RNase 抑制剂
体外 F2-RNA pull-down	5 mL	25 μL	2.5 μL
体内 F2-RNA pull-down	3 mL	15 μL	1.5 μL

4. RNA pull-down（以下方案二选一操作）

4.1 体外 F2-RNA pull-down

- (1) 取 3 μg RNA 探针，95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min，冰浴 1 min，短暂离心甩下管壁液体，向管中加入 50 μL ④RNA 结构缓冲液和 1 μL ⑧RNase 抑制剂，室温放置 30 min；
- (2) 将实验组和对照组 RNA 探针分别加入对应的磁珠（步骤 2 制备）中，混匀仪上室温孵育 30 min；
- (3) 放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (4) 每组加入 500 μL 漂洗液（步骤 3 准备），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (5) 重复上步操作一次；
- (6) 加入相应组别的样本裂解液（步骤 1 制备），放混匀仪上 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2~4 h；
- (7) 放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (8) 每组加入 500 μL 漂洗液（步骤 3 准备），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；

- (9) 重复上步操作两次，共漂洗三次；
- (10) 每组加入 50 μ L ⑥洗脱缓冲液，涡旋震荡 20 s，放混匀仪上室温洗脱 10~15 min；
- (11) 涡旋震荡 20 s，1000 g 离心 20 s，放磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中，-80 $^{\circ}$ C 保存，或直接用 Western-blot、SDS-PAGE 或质谱实验。

* 注意：i. 洗脱缓冲液可以兼容质谱，辉骏生物也可以提供蛋白质的质谱检测服务。

ii. RNA pull-down 捕获的蛋白量通常较少，因此 SDS-PAGE 建议用硝酸银染色而非考马斯亮蓝染色，硝酸银染色步骤参考如下：

- (1) 固定：30 min（乙醇：乙酸：水=4：1：5 体积比）；
- (2) 敏化：30 min（乙酸钠 10.2 g，硫代硫酸钠 0.471 g，乙醇 45 mL，加水至 150 mL）；
- (3) 水洗：4 次，每次 10 min；
- (4) 银染：30 min（硝酸银 0.375 g，加水至 150 mL）；
- (5) 水洗：2 次，每次 40 s；
- (6) 显色：显影至条带清楚（碳酸钠 4.5 g，72 μ L 甲醛，加水至 180 mL）；
- (7) 终止：5 min（Na₂EDTA 2.19 g，加水至 150 mL）。

4.2 体内 F2-RNA pull-down

- (1) 将实验组和对照组样本裂解液（步骤 1 制备）分别加入对应的磁珠（步骤 2 制备）中，放混匀仪上 4 $^{\circ}$ C 孵育 2~4 h，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (2) 每组加入 500 μ L 漂洗液（步骤 3 准备），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (3) 重复上步操作两次，共漂洗三次；
- (4) 每组加入 50 μ L ⑥洗脱缓冲液，涡旋震荡 20 s，放混匀仪上室温洗脱 10~15 min；
- (5) 涡旋震荡 20 s，1000 g 离心 20 s，放磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中，-80 $^{\circ}$ C 保存，或直接用 Western-blot、SDS-PAGE 或质谱实验。

* 注意：i. 洗脱缓冲液可以兼容质谱，辉骏生物也可以提供蛋白的质谱检测服务。

ii. RNA pull-down 捕获的蛋白量通常较少，因此 SDS-PAGE 建议用硝酸银染色，染色步骤详见方案 4.1。

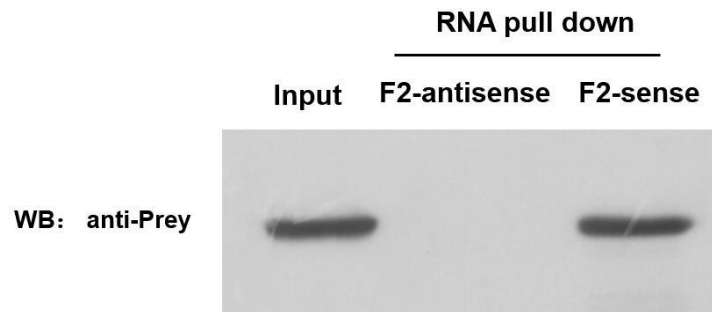
问题解决

问题	可能原因	解决方案
获得的蛋白复合物少	样本蛋白量不够	提高样本用量
	孵育时间不够	延长孵育时间（如孵育过夜），但需要注意孵育时间过长也可能导致非特异性结合增多
	RNA 探针量不够	提高 RNA 探针用量
获得的复合物杂蛋白多	非特异性的蛋白结合在磁珠上	增加漂洗时间和次数，或样本预处理：先与磁珠孵育，去除非特异结合蛋白

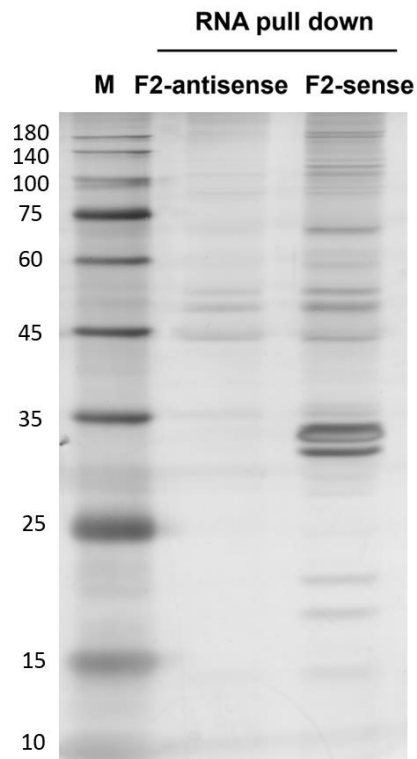
使用案例

实验目标：检测目标 RNA 与待测蛋白（Prey）是否存在相互作用。

- (1) Input: 样本裂解液;
- (2) F2-antisense: F2-RNA 反义链探针的 pull-down 产物（对照组）;
- (3) F2-sense: F2-RNA 正义链探针的 pull-down 产物（实验组）。



待测蛋白的 RNA pull-down WB 检测图



RNA pull-down 蛋白银染图