

说明书

生物素 RNA pull-down 试剂盒（动物）

产品信息

货号	产品名称	规格
FI8702-12T	生物素 RNA pull-down 试剂盒（动物）	12 次
FI8702-24T	生物素 RNA pull-down 试剂盒（动物）	24 次
FI8702-40T	生物素 RNA pull-down 试剂盒（动物）	40 次

产品描述

RNA pull-down 是检测 RNA 及其结合蛋白（RNA binding protein, RBP）之间相互作用的主要方法之一。辉骏生物生产的 RNA pull down 试剂盒利用链霉亲和素磁珠与生物素的强亲和力，高效调取目标 RNA 及其结合蛋白。

首先制备体外转录的生物素标记 RNA 作为探针，与样本裂解液孵育，RNA 探针与样本中的蛋白质结合形成复合物；链霉亲和素磁珠特异性捕获生物素标记的 RNA，同时实现对 RNA 结合蛋白（RBPs）的捕获富集；之后可以采用 Western Blot 技术检测特定蛋白，也可以采用质谱（LC-MS/MS）技术鉴定未知蛋白。

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	15 mL	30 mL	50 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	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、DNA 凝胶回收试剂盒、生物素 RNA 标记混合物（Biotin RNA labeling Mix）、RNA 纯化试剂盒（RNeasy Mini Kit）（可选）、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 的离心管、枪头等实验材料。
4. 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。
5. 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

RNA 探针制备

- (1) 根据目标 RNA 序列设计带有 T7 启动子（TAATACGACTCACTATAGGG）的引物，以目标序列的 DNA 质粒为模板，PCR 分别获得 T7-正义 RNA（实验组）和 T7-反义 RNA（对照组）转录模板，按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明书要求回收纯化目标 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	5'- 目标 RNA 尾部序列的反向互作序列 -3'
反义链-正引物	5'- 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
DNA 模板	0.5 μ g
10*Reaction Buffer	2 μ L
10*Biotin RNA labeling Mix	2 μ L
T7 RNA Polymerase Enzyme Mix	2 μ L
RNase-free H ₂ O	Up to 20 μ L

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

- (3) 为了避免转录产物中的游离生物素 UTP 竞争结合磁珠，此处最好采用 RNA 纯化试剂盒来处理转录产物，但此操作可能造成一定的产物损失，可以根据具体情况决定是否进行此步操作；
- (4) 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。

III 操作方法

1. 总蛋白提取

1.1 动物细胞

- (1) 实验组和对照组一共取 $2 \times 10^7 \sim 4 \times 10^7$ 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) 加入 0.6~1 mL 预冷的②裂解缓冲液、6~10 μL ⑦蛋白酶抑制剂（按 1% 添加）和 3~5 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，剩余上清平分为两份，记为实验组 and 对照组，-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存或直接用于 RNA pull down 实验。

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) 实验组和对照组共取 0.2~0.4 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) 加入 0.6~1 mL 预冷的②裂解缓冲液、6~10 μL ⑦蛋白酶抑制剂（按 1% 添加）和 3~5 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，剩余上清平分为两份，记为实验组 and 对照组，-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存或直接用于 RNA pull down 实验。

*** 注意：**

- i. 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。
- ii. 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. 磁珠准备

- (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) 将磁珠平分为两份，每组各约 200 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⑨10 mL 离心管，加入实验组和对照组总共所需的 5 mL ⑤漂洗液、25 μL ⑦蛋白酶抑制剂（按 0.5%添加）和 2.5 μL ⑧ RNase 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。

4. RNA pull-down

- (1) 取实验组和对照组 RNA 探针各 3 μg ，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，室温放置 30 min；
- (2) 将 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），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) 重复上步漂洗操作两次，共漂洗三次；
- (10) 每组加入 50 μL 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 $^{\circ}\text{C}$ 保存，或直接用于 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. 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）。

问题解决

问题	可能原因	解决方案
获得的复合物少	样本或蛋白量不够	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 量不够	提高 RNA 用量
多条非特异条带	非特异性的蛋白结合在磁珠上	增加漂洗时间和次数

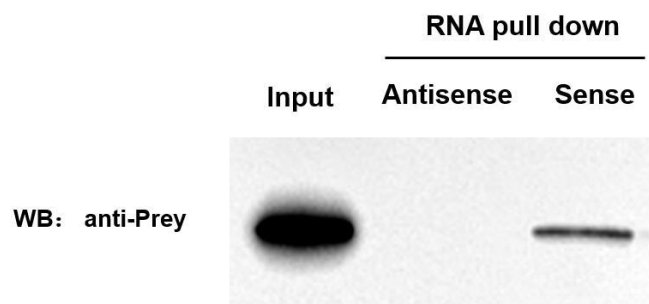
使用案例

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（总蛋白）；

(2) Antisense：目标 RNA 反义链探针的 pull-down 产物（对照组）；

(3) Sense：目标 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