

**F2-RNA Pull-Down 试剂盒（植物）****F2-RNA Pull-Down Kit for Plant****产品信息**

货号	产品名称	规格
FI8711-12T	F2-RNA Pull-Down Kit for Plant	12 次
FI8711-24T	F2-RNA Pull-Down Kit for Plant	24 次
FI8711-40T	F2-RNA Pull-Down Kit for Plant	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 及其结合蛋白或结合 RNA。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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ L	1.3 mL	2.2 mL	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑦	蛋白酶抑制剂	230 $\mu$ L	460 $\mu$ L	760 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑧	RNase 抑制剂	65 $\mu$ L	130 $\mu$ L	220 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑨	F2 配体	250 $\mu$ L	500 $\mu$ L	840 $\mu$ 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  $\mu$ 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：PBS、RNase-free 水、制备 RNA 探针所需的材料【T7 体外转录试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒】、微量 RNA 提取试剂盒或提取 RNA 所需的材料【Trizol、氯仿、异丙醇、75%乙醇】。
2. 所需仪器：磁力架（辉骏产品货号 F17101）、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，请在使用前通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀磁珠。
3. 请务必使用无 RNase 的实验材料：如离心管、枪头等。
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) 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 $\mu$ L
ATP/ GTP/ UTP/ CTP	各 2 $\mu$ L
DNA 模板	0.5 $\mu$ g
T7 RNA Polymerase Enzyme Mix	2 $\mu$ L
RNase-free H <sub>2</sub> O	Up to 20 $\mu$ L

37°C 孵育 2 h，之后加入 1  $\mu$ L DNase I，37°C 孵育 15min 将 DNA 模板消化，得到正义 RNA 和反义 RNA；

(3) 取 2  $\mu\text{L}$  RNA 检测浓度；取 1~2  $\mu\text{L}$  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. 样本裂解

- (1) 实验组 and 对照组一共取 0.4~0.6 g 植物组织，用 RNase-free 水清洗干净，置于研钵中，用液氮充分研磨，再转移粉末至预冷的、新的无 RNase 离心管中；
- (2) 将样本管置于冰上，加入 1 mL 预冷的②裂解缓冲液、10  $\mu\text{L}$  ⑦蛋白酶抑制剂（按 1%添加）和 5  $\mu\text{L}$  ⑧RNA 酶抑制剂（按 0.5%添加），吹打混匀；
- (3) 冰上超声破碎至溶液基本澄清；
- (4) 4 $^{\circ}\text{C}$  12000 g 离心 15 min，收集上清至新的无 RNase 离心管中；
- (5) 取 30  $\mu\text{L}$  作为 input，剩余上清平分为两份用于 pull-down 实验，记为实验组和对照组，置于冰上备用或 -80 $^{\circ}\text{C}$  保存。

**\* 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。
- ii. 如果样本中目标蛋白或 RNA 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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  ③NT2 缓冲液，上下颠倒重悬磁珠；
- (5) 加入 40  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$ ，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，加入实验组和对照组总共所需的 5 mL ⑤漂洗液、25  $\mu$ L ⑦蛋白酶抑制剂（按 0.5%添加）和 2.5  $\mu$ L 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 3  $\mu$ g RNA 探针，95 $^{\circ}$ 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  $\mu$ L ④RNA 结构缓冲液和 1  $\mu$ L 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  $\mu$ 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；
- (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 $^{\circ}$ 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  $\mu$ 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；
- (9) 重复上步操作两次，共漂洗三次，保留磁珠。

### 5. 蛋白洗脱（选做）

如果需要对 pull down 产物进行蛋白检测，可以在以下方案中选择合适的洗脱方法。

- (1) 非变性洗脱法：向磁珠中加入 50  $\mu$ L ⑥洗脱缓冲液，涡旋震荡 20 s，混匀仪上室温洗脱 10~15 min；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。该洗脱产物保持原有的生物活性，适用于后期各种检测，例如质谱、SDS-PAGE 或 Western-blot 等。
- (2) SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法（变性洗脱法）：向磁珠中加入 50  $\mu$ L 1 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液，95  $^{\circ}$ C 加热 5 min；磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中。该洗脱产物适用于 SDS-PAGE 或 Western Blot 检测；如果需要进行质谱检测，则切胶条后送检。

#### \* 注意：

- i. 本试剂盒提供的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. 如果选择非变性洗脱法，可以暂时保留洗脱后的磁珠，当非变性洗脱效率较低时，则采用 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法继续洗脱蛋白。
- iii. 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  $\mu$ L 甲醛，加水至 180 mL）；
- (7) 终止：5 min（Na<sub>2</sub>EDTA 2.19 g，加水至 150 mL）。

**6. RNA 提取纯化（选做）**

如果需要对 pull down 产物进行 RNA 检测，可以购买微量 RNA 提取试剂盒或按照以下步骤提取 RNA。

- (1) 向磁珠中加入 1 mL Trizol，室温静置 5 min，4  $^{\circ}$ C 12000 g 离心 10 min，取上清；
- (2) 加入 0.2 mL 氯仿，涡旋混匀或猛烈晃动 15 s，室温放置 2~3 min；
- (3) 4  $^{\circ}$ C 12000 g 离心 15 min，吸取水相至新的无 RNase 离心管中（约可吸取 0.5-0.55 mL）；
- (4) 加入 0.5 mL 异丙醇，颠倒数次混匀，室温下沉淀 10 min 或 -20  $^{\circ}$ C 沉淀过夜；
- (5) 4  $^{\circ}$ C 12000 g 离心 10 min，管底可见 RNA 沉淀，弃上清；
- (6) 加入 1 mL 75%乙醇（DEPC 水或 RNase-free 水配制）；
- (7) 4 $^{\circ}$ C 12000 g 离心 10 min，弃上清；5000 g 快速离心 1 s，小心吸尽液体；
- (8) 待 RNA 略干后，加入 20  $\mu$ L DEPC 水或 RNase-free 水或溶解，-80  $^{\circ}$ C 保存或直接进行反转录。

- \* 注意：i. RIP 后的 RNA 一般较微量，操作时注意勿把 RNA 沉淀吸走；  
 ii. 切勿让 RNA 过分干燥，否则将极难溶解，且测出的 A260/280 值会低于 1.6。

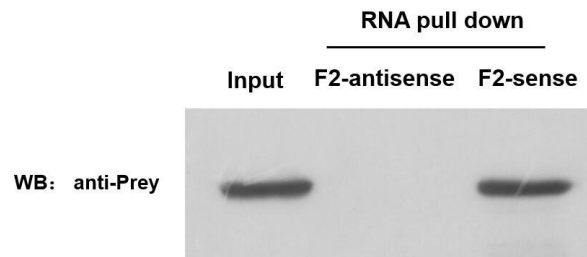
**问题解决**

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
SDS-PAGE 检测有很多非特异结合的条带	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

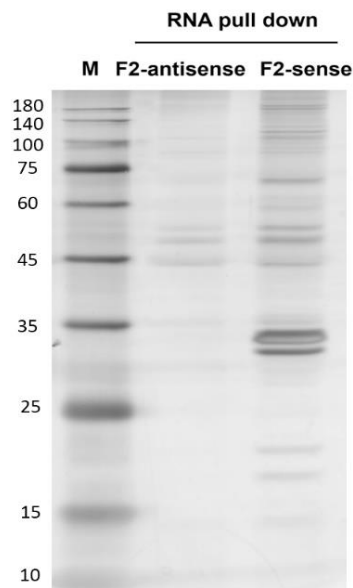
## 使用案例

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 F2-RNA pull-down WB 检测图



F2-RNA pull-down 蛋白银染图