

货号	名称	规格	存储
F1502-12T	生物素 RNA Pull-Down 试剂盒（动物）	12T	-20℃
F1502-24T	生物素 RNA Pull-Down 试剂盒（动物）	24T	-20℃
F1502-40T	生物素 RNA Pull-Down 试剂盒（动物）	40T	-20℃

产品简介

RNA pull-down 是检测目标RNA与其结合蛋白或结合RNA之间相互作用的主要方法之一。生物素RNA Pull-Down 试剂盒利用链霉亲和素磁珠与生物素之间的强亲和力，高效调取目标RNA及其结合蛋白或结合RNA。

首先制备生物素标记的RNA探针，与样本裂解液孵育，RNA探针与样本中的某些蛋白质或RNA结合形成复合体；链霉亲和素磁珠特异性捕获生物素标记的RNA探针，同时捕获其结合蛋白或结合RNA；之后可以采用Western Blot、质谱（LC-MS/MS）方法检测结合蛋白，或者采用qPCR、测序（seq）方法检测结合RNA。

试剂盒成分

编号	名称	12T 规格	24T 规格	40T 规格	储存条件
①	链霉亲和素磁珠	500 μ L	1 mL	1.7 mL	4℃，1 年
②	裂解缓冲液	7mL	14mL	22 mL	4℃，1 年
③	NT2 缓冲液	15mL	30 mL	50mL	4℃，1 年
④	RNA 结构缓冲液	650 μ L	1.3mL	2.2mL	4℃，1 年
⑤	漂洗液	32mL	64 mL	105mL	4℃，1 年
⑥	洗脱缓冲液	650 μ L	1.3mL	2.2mL	-20℃，1 年
⑦	蛋白酶抑制剂	230 μ L	460 μ L	760 μ L	-20℃，1 年
⑧	RNase 抑制剂	65 μ L	130 μ L	220 μ L	-20℃，1 年
⑨	10mL 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

- 自备材料：PBS、RNase-free 水、生物素标记的 RNA 探针或制备探针所需的材料【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）】、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】。
- 所需仪器：磁力架、混匀仪、低温离心机、超声波破碎仪。

使用说明

I 注意事项

- 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。
- 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。
- 请务必使用无 RNase 的离心管、枪头等实验材料。**
- 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。
- 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 尾部序列的反向互补序列-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 尾部序列的反向互补序列-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 2h, 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 μ L RNA 检测浓度, 取 1~2 μ 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°C 保存或直接用于后续实验。

* 注意:

- 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。
- 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

1.1 动物细胞

- 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°C 500 g 离心 5 min 收集细胞沉淀, 彻底去除培养基成分;
- 将样本置于冰上, 加入 0.6~1 mL 预冷的②裂解缓冲液、6~10 μ L ⑦蛋白酶抑制剂 (按 1% 添加) 和 3~5 μ L ⑧RNA 酶抑制剂 (按 0.5% 添加), 吹打混匀;
- 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, 可置于冰上裂解 30 min, 期间每 10 min 涡旋混匀一次, 每次 5s;
- 4°C 12000 g 离心 15 min, 收集上清至新的无 RNase 离心管中; 取 30 μ L 作为 input, 剩余上清平分为两份用于 RNA pull-down 实验 (记为实验组和对照组), 置于冰上备用或 -80°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, 转移粉末至预冷的、新的无 RNase 离心管中;
- (3) 将样本置于冰上, 加入 0.6~1 mL 预冷的②裂解缓冲液、6~10 μ L ⑦蛋白酶抑制剂 (按 1%添加) 和 3~5 μ L 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℃ 12000 g 离心 15 min, 收集上清至新的无 RNase 离心管中;
- (6) 取 30 μ L 作为 input, 剩余上清平分为两份用于 RNA pull-down 实验 (记为实验组和对照组), 置于冰上备用或 -80℃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. 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 μ 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 μ L 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 μ 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 μ L ⑦蛋白酶抑制剂 (按 0.5%添加) 和 2.5 μ L 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。

4. RNA pull-down

- (1) 取实验组和对照组 RNA 探针各 3 μ g, 95℃变性 3 min, 冰浴 1 min, 短暂离心甩下管壁液体, 向管中加入 50 μ L 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 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;
- (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℃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 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;
- (9) 重复上步漂洗操作两次, 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 μ 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 20s, 1000g 离心 20s; 放磁力架上静置 1 min, 收集上清至新的离心管中, -80℃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 μ 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。

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：

（为了便于称量，每步配置的溶液体积较大，实际操作时取适量溶液浸泡胶即可）

- (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 3.75 g，60 μ L 甲醛，加水至 150 mL）；
- (7) 终止：5 min（Na₂ 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，请购买微量 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，涡旋混匀或剧烈晃动 15 s，室温放置 2~3 min；
- (3) 4 $^{\circ}$ C 12000g 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 12000g 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 12000g 离心 10 min，弃上清；5000g 快速离心 1s，小心吸尽液体；
- (8) 待 RNA 略干后，加入 20 μ L DEPC 水或 RNase-free 水或溶解，-80 $^{\circ}$ C 保存或直接进行反转录。

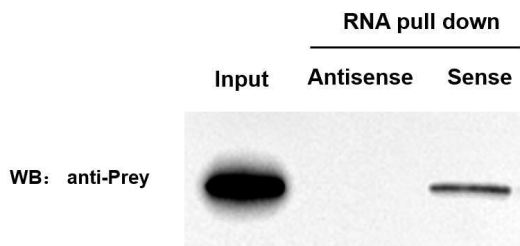
*** 注意：**i. Pull down 后的 RNA 一般较微量，操作时注意勿把 RNA 沉淀吸走；

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。

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) 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