

# 说明书

## 生物素 RNA pull-down 试剂盒

货号	描述
<b>FI8702-12T</b>	生物素 RNA pull-down 试剂盒，包含足够完成 12 个反应的试剂，每个反应用 40 $\mu$ L 磁珠。由于每次 pull-down 需要设置实验组和对照组，因此本试剂盒可以完成 6 次 pull-down 实验。

### 试剂盒组分

编号	名称	体积（12 Tests）	储存条件
①	链霉亲和素磁珠	500 $\mu$ L	4 $^{\circ}$ C，1 年
②	裂解缓冲液	7 mL	4 $^{\circ}$ C，1 年
③	NT2 缓冲液	16 mL	4 $^{\circ}$ C，1 年
④	RNA 结构缓冲液	650 $\mu$ L	4 $^{\circ}$ C，1 年
⑤	漂洗液	32 mL	4 $^{\circ}$ C，1 年
⑥	洗脱缓冲液	650 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C，1 年
⑦	蛋白酶抑制剂	230 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C，1 年
⑧	RNase 抑制剂	65 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C，1 年
⑨	10 mL 离心管	——	——

### 目录

I 产品简介 .....	2
II 重要产品信息 .....	2
III 额外所需的主要材料和仪器 .....	2
IV 实验前准备工作 .....	2
V 操作方法 .....	3
VI 问题解决 .....	5
VII 使用案例 .....	5

## I 产品简介

生物素 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。

## II 重要产品信息

- 请勿干燥或冷冻磁珠，这些操作会导致磁珠聚集而降低结合能力。
- 由于煮沸会导致磁珠聚集并且失去结合能力，经煮沸的磁珠不应再次使用。
- 裂解缓冲液可兼容 BCA 蛋白定量。

## III 额外所需的主要材料和仪器

- **自备试剂：** 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）、PBS、RNase-free 水。
- **所需仪器：** 低温离心机、混匀仪、磁力架、超声仪（动物组织、植物和微生物样本裂解需要）。

## IV 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 μg
10*Reaction Buffer	2 μL
10*Biotin RNA labeling Mix	2 μL
T7 RNA Polymerase Enzyme Mix	2 μL
RNase-free H <sub>2</sub> O	Up to 20 μL

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

(3) 根据 RNA 纯化试剂盒说明书操作去除 RNA 产物中游离的生物素 UTP；

(4) 取 2  $\mu$ L RNA 检测浓度；取 1~2  $\mu$ 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：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。

## V 操作方法

\* 注意：

- 请务必使用无 RNase 的实验材料：如离心管、枪头等。
- 为保证磁珠均匀分布，请反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀瓶中磁珠。
- 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。

### 5.1 样本裂解

(1) 按如下方法收集和处理样本：

样本类型	样本量/组	收集方法
动物细胞	1 $\times$ 10 <sup>7</sup> ~ 2 $\times$ 10 <sup>7</sup> 个	冷 PBS 漂洗 2~3 次，彻底去除培养基成分，4 °C 500 g 离心 5 min 收集沉淀
动物组织	100~200 mg	冷 PBS (RNase-free) 清洗干净，彻底去除血液等成分，液氮充分研磨
植物组织	200~300 mg	RNase-free 水清洗干净，液氮充分研磨
微生物	50 $\mu$ L 菌体沉淀	冷 PBS 漂洗 2~3 次，彻底去除培养基成分，4 °C 5000 g 离心 5 min 收集沉淀

(2) 样本加入 300~500  $\mu$ L 预冷的②裂解缓冲液、3~5  $\mu$ L ⑦蛋白酶抑制剂（按 1:100 添加）和 1.5~2.5  $\mu$ L ⑧RNA 酶抑制剂（按 1:200 添加），吹打混匀。

(3) a. 动物细胞：置于冰上裂解 30 min（间隔手动混匀）；为了更充分裂解，也可以冰上超声至溶液基本澄清。

b. 动物组织：最好冰上超声破碎至溶液基本澄清，也可以置于冰上裂解 30 min（间隔手动混匀）。

c. 植物、微生物：冰上超声破碎至溶液基本澄清。

(4) 4°C 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中；取 30  $\mu$ L 作为 input，剩余用于 RNA pull-down 实验，-80°C 保存。

\* 注意：当样本不能完全裂解时（溶液很浑浊），可以适当增加裂解缓冲液的用量继续裂解。根据经验，提取到的样本蛋白浓度通常不低于 5  $\mu$ g/ $\mu$ L，总量约 2~3 mg。如果样本中目标蛋白丰度较低，或结合物间的结合较弱，也可以增加初始样本量。裂解缓冲液的最小使用体积为 300  $\mu$ L，当样本量增加时，裂解液缓冲液和抑制剂可等比例增加，但总孵育体积最大不超过离心管体积的 2/3。超声条件因样本类型和超声设备而异，可提前摸索好合适的条件。

## 5.2 磁珠准备

- (1) 每组实验取 40  $\mu\text{L}$  ①磁珠，加入 500  $\mu\text{L}$  ③NT2 缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (2) 再次加入 500  $\mu\text{L}$  ③NT2 缓冲液洗涤磁珠，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (3) 加入 200  $\mu\text{L}$  ③NT2 缓冲液，上下颠倒重悬磁珠。

## 5.3 漂洗液准备

取出⑨10 mL 离心管（空管），加入本次实验 2 组样本（实验组+对照组）所需的 5 mL ⑤漂洗液、25  $\mu\text{L}$  ⑦蛋白酶抑制剂（按 1:200 添加）和 2.5  $\mu\text{L}$  ⑧RNase 抑制剂（按 1:2000 添加），混合均匀，冰上保存，现配现用。

\* **注意：** 如果有多组样本，按照实际使用量配置。

## 5.4 RNA pull-down

- (1) 将 3  $\mu\text{g}$  RNA 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  $\mu\text{L}$  ④RNA 结构缓冲液，室温放置 30 min。
- (2) 将 RNA 探针加入磁珠（5.2 制备）中，放混匀仪上室温孵育 30 min；放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (3) 加入 500  $\mu\text{L}$  漂洗液（5.3 配置），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；重复该漂洗操作一次。
- (4) 加入样本裂解液（5.1 制备），放混匀仪上 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2~4 h；放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (5) 加入 500  $\mu\text{L}$  漂洗液（5.3 配置），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；重复该漂洗操作两次。
- (6) 加入 50  $\mu\text{L}$  ⑥洗脱缓冲液，涡旋震荡 20 s，放混匀仪上室温洗脱 10~15 min，涡旋震荡 20 s。
- (7) 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：** 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  $\mu\text{L}$  甲醛，加水至 180 mL）；
- (7) 终止：5 min（ $\text{Na}_2\text{EDTA}$  2.19 g，加水至 150 mL）。

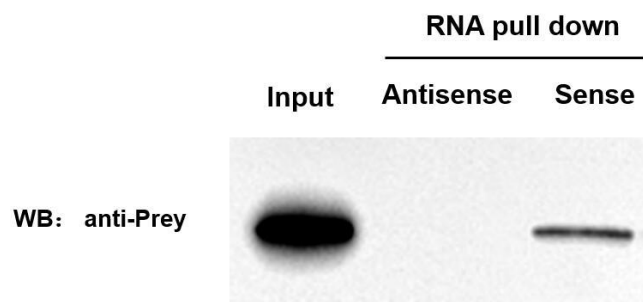
## VI 问题解决

问题	可能原因	解决方案
获得的复合产物少	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会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

## VII 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