



RNA pull-down Kit

Catalog# JKR23004

Instruction Manual (For Two Groups)

Sufficient reagents for 6T RNA pull-down assays per kit.

Store at -20 & 4°C

目录

1. 实验原理	02
2. 实验流程	02
3. 试剂盒组分	04
4. 操作步骤	04
5. 常见问题	07

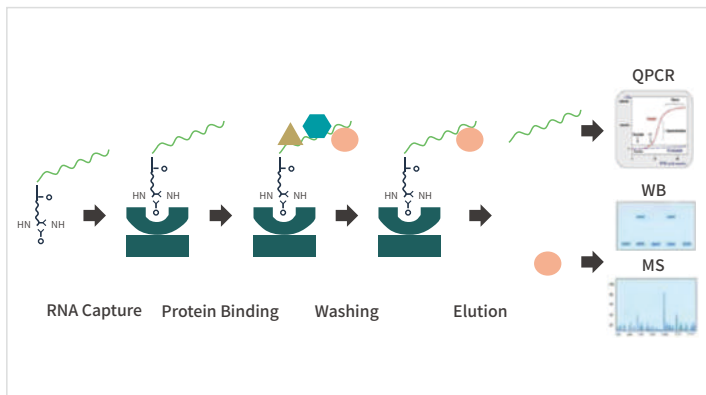


1. 实验原理

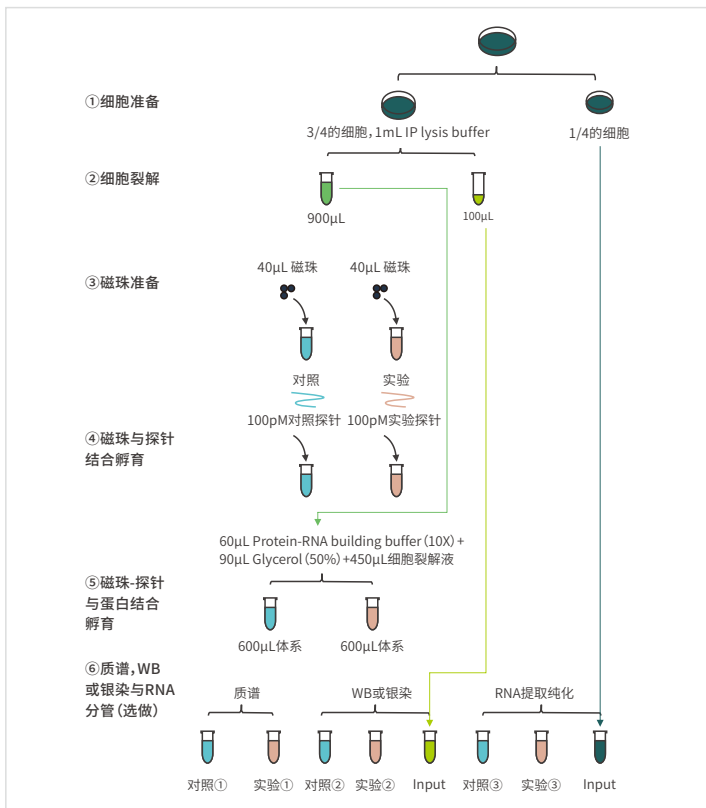
RNA pull-down是研究细胞内RNA与蛋白/RNA结合情况的技术。先将RNA进行标记(如生物素标记),再与细胞裂解液共同孵育,从而形成RNA-RNA/蛋白质复合物,进而检测与之结合的RNA或蛋白质。复合物洗脱后,通过荧光定量PCR(RNA pull down- QPCR)或高通量测序(RNA pull down-seq)方法来鉴定目标RNA是否与某些RNA分子相互作用,通过Western blot(pull down-WB)实验和质谱(pull down-MS)技术检测目标RNA是否与某些蛋白相互作用。

2. 实验流程

2.1 实验流程图



2.2 对照设置流程图



3. 试剂盒组分

组分	容量(6T)	保存温度
Nucleic-Acid Compatible Streptavidin Magnetic Beads	270 μ L	4 $^{\circ}$ C
RNA binding buffer	6mL	4 $^{\circ}$ C
Wash Buffer I	20mL	4 $^{\circ}$ C
Protein-RNA binding buffer (10X)	600 μ L	4 $^{\circ}$ C
IP lysis buffer	9mL	4 $^{\circ}$ C
Protease inhibitor (100 X)	35 μ L	-20 $^{\circ}$ C
Glycerol (50%)	800 μ L	4 $^{\circ}$ C
Wash Buffer II	10mL	4 $^{\circ}$ C
Solution I	600 μ L	4 $^{\circ}$ C
Elution Buffer	800 μ L	4 $^{\circ}$ C避光
DEPC水	400 μ L	4 $^{\circ}$ C

特别提示1:需自备75%乙醇、Trizol、氯仿、异丙醇、1 x PBS、逆转录试剂盒及荧光染料等试剂。

特别提示2: 6T为6次单组(1次实验组或1次对照组)免疫沉淀实验,后面的操作步骤中包含了实验组和对照组各1组,需消耗2T试剂。

4. 操作步骤

A: RNA与蛋白结合(选做)

4.1 样本裂解

4.1.1 细胞样本

- ① 裂解液准备:取990 μ L的IP lysis buffer,加入10 μ L Protease inhibitor(100X),混匀;
- ② 收集 2×10^7 个细胞样品,加入2mL PBS洗涤细胞,离心后弃上清收集细胞沉淀,预留

1/4的细胞样品用于后续Input组的RNA提取及纯化(使用无核酸酶的EP管存放, -80°C保存);

- ③ 向剩余细胞沉淀中加入裂解液重悬,并用移液枪吹打混匀10次,使细胞充分裂解,冰浴30min,每5min涡旋一次,10s/次。
- ④ 裂解完成后用超声波细胞破碎仪冰浴超声5min,20%的功率,超声3s,间歇3s。
- ⑤ 4°C 12000rpm离心10min,取上清,再向上清中加入IP Lysis Buffer补充体积至1mL,混匀,并按照450 μ L(对照组)、450 μ L(实验组)、100 μ L(Input)分成三份,Input样品-80°C保存备用。

4.1.2 动物组织

- ① 裂解液准备:取990 μ L的IP lysis buffer,加入10 μ L Protease inhibitor(100X),混匀;
- ② 取新鲜组织或低温组织(约0.3g),置于灭菌后预冷的研钵中,加入液氮快速研磨至粉末状,收集约1/4的样品预留用于后续Input组的RNA提取(使用无核酸酶的EP管存放, -80°C保存);
- ③ 向研钵剩余样品中加入800 μ L 裂解液,在冰上继续研磨5-10min至样品成细腻的匀浆状,转移至新的EP管中,再向研钵中加入剩余的200 μ L裂解液收集残留的样品,同样转移至该EP管;
- ④ 装有样品匀浆的EP管在冰上充分裂解30min,每5min涡旋一次,10s/次;
- ⑤ 裂解完成后用细胞超声破碎仪冰浴超声8-10min,20%功率,超声3s,间歇3s。
- ⑥ 4°C, 12000rpm离心10min,收集上清,再向上清中加入IP Lysis Buffer补充体积至1mL,混匀,并按照450 μ L(对照组)、450 μ L(实验组)、100 μ L(Input)分成三份,Input样品-80°C保存备用。

B: RNA与RNA结合(选做)

4.1 猎物RNA获取

4.1.1 从样本中提取猎物RNA(猎物RNA未知);

4.1.2 直接合成猎物RNA(猎物RNA已知);

4.1.3 通过PCR扩增,琼脂糖凝胶回收,体外转录等一系列步骤获得猎物RNA(猎物RNA已知);

备注:若猎物RNA已知,需要提前对获得的RNA进行测定。3种方式获得的猎物RNA均需预留1/4作为Input以备后续作为检测参照。

4.2 磁珠与RNA结合

- ① 磁珠准备:取2个1.5mL无核酸酶的EP管标记好对照组和实验组,取出试剂盒中 Nucleic-Acid Compatible Streptavidin Magnetic Beads,充分混匀后,取40 μ L磁珠加入到EP管中;
- ② 将2个EP管放到磁力架上,静置1min,吸弃保护液;
- ③ 用200 μ L Wash Buffer I洗涤磁珠,涡旋震荡EP管重悬磁珠,微型离心机低速离心后放到磁力架上,静置1min,吸弃Wash Buffer I,该步骤共实施3次;
- ④ 向洗涤完成的磁珠中加入300 μ L的1X RNA binding buffer,涡旋震荡EP管重悬磁珠;
- ⑤ 向实验组EP管加入150pmol生物素标记的实验探针,向对照组EP管加入150pmol生物素标记的对照探针,并用移液枪轻轻吹打混合;
- ⑥ 放在静音混合仪上,室温旋转孵育2h。

4.3 RNA-磁珠复合物与蛋白结合

A:RNA-磁珠复合物与蛋白结合(选做)

- ① 将已完成RNA-磁珠孵育的2个EP管放到磁力架上,吸弃上清;
- ② 用200 μ L Wash Buffer I洗涤磁珠,涡旋震荡EP管重悬磁珠,微型离心机低速离心后放到磁力架上,静置1min,吸弃Wash Buffer I,该步骤共实施3次;
- ③ 按照下表依次向洗涤完成的EP管中加入对应体积的试剂;

试剂	加入的试剂体积参考量(μ L)
Protein-RNA building buffer (10X)	60
Glycerol (50%)	90
4.1制备的蛋白裂解液	450

- ④ 涡旋混匀后4 $^{\circ}$ C搅拌孵育过夜。

B:RNA-磁珠复合物与RNA结合(选做)

- ① 将已完成RNA-磁珠孵育的2个EP管放到磁力架上,吸弃上清;

- ② 用200 μ L Wash Buffer I洗涤磁珠，涡旋震荡EP管重悬磁珠，微型离心机低速离心后放到磁力架上，静置1min，吸弃Wash Buffer I，该步骤共实施3次；
- ③ 向洗涤完成的磁珠中加入300 μ L的1X RNA binding buffer，涡旋震荡EP管重悬磁珠；
- ④ 分别向对照组和实验组的EP管中加入20 μ g或200pmol的猎物RNA，并用移液枪轻轻吹打混合，4 $^{\circ}$ C搅拌孵育过夜；
- ⑤ 将EP管放到磁力架上，吸弃上清；
- ⑥ 用200 μ L的Wash Buffer I洗涤磁珠，通过涡旋EP管重悬磁珠，微型离心机低速离心后放到磁力架上，静置1min，吸弃Wash Buffer I，收集磁珠，该步骤共实施3次，跳过步骤4.4。

4.4 RNA结合蛋白复合物的洗涤

- ① 将4.3A中已完成蛋白-RNA-磁珠孵育的EP管放到磁力架上，吸弃上清；
- ② 用200 μ L的Wash Buffer I洗涤磁珠，通过涡旋EP管重悬磁珠，微型离心机低速离心后放到磁力架上，静置1min，吸弃Wash Buffer I，收集磁珠；
- ③ 用200 μ L的Wash Buffer II洗涤磁珠，通过涡旋EP管重悬磁珠，微型离心机低速离心后放到磁力架上，静置1min，吸弃Wash Buffer II，收集磁珠，该步骤共实施3次；
- ④ 向洗涤完成的EP管中加入200 μ L Wash Buffer II，混匀后取若干体积分到对应的管中（若下游实验有2种或以上，则需要将磁珠进行分管，对照组和实验组均要设置，下游实验有几种，则各标记几管，建议体积按照WB/银染:qPCR:质谱=3:5:2进行分配）。
- ⑤ 将分出磁珠的EP管放入微型离心机低速离心，再放到磁力架上，静置1min，吸弃Wash Buffer II，收集磁珠。

4.5 蛋白洗脱（下游为WB或银染，选做）

- ① 向2个洗涤完成的EP管中各加入100 μ L的Elution Buffer，混匀，沸水煮10min；
- ② 微型离心机低速离心后放到磁力架上，静置1min，吸取上清到新标记好的EP管中；
- ③ 向2个新EP管中加入10 μ L 6 x Loading Buffer，4.1步骤加入裂解液后预留的100 μ L Input亦加入10 μ L 6 x Loading Buffer，混匀，放在-20 $^{\circ}$ C保存。

4.6 RNA提取（下游为QPCR，选做）

- ① 向2个洗涤完成的EP管中各加入500 μ L的Trizol，4.1步骤预留1/4细胞的EP管中亦加

入500 μ L的Trizol, 涡旋混匀, 静置5min, 加入100 μ L的氯仿, 涡旋混匀, 4 $^{\circ}$ C 14000rpm离心10min;

- ② 取上层水相(约250 μ L)到新的EP管中, 加入50 μ L solution I和500 μ L的异丙醇, 涡旋混匀, -80 $^{\circ}$ C沉淀RNA过夜;
- ③ 取出过夜沉淀的EP管放在4 $^{\circ}$ C解冻, 4 $^{\circ}$ C 14000rpm离心10min, 弃上清;
- ④ 加入1mL 75%的乙醇, 涡旋混匀, 4 $^{\circ}$ C静置5min, 4 $^{\circ}$ C 14000rpm离心10min, 弃上清, 该步骤共实施3次;
- ⑤ 开盖室温晾3-5min, 加入适量(10-20 μ L) DEPC水溶解RNA。

4.7 质谱(下游为质谱, 选做:若质谱样本为蛋白液, 则可直接从4.5步骤中取样, 无需操作此步骤)

- ① 向洗涤完成的EP管中加入200 μ L预冷的1XPBS洗涤磁珠, 磁力分离, 弃洗涤液, 该步骤共实施3次;
- ② -20 $^{\circ}$ C保存待质谱鉴定。

5. 常见问题

Q1:实验全程如何预防RNA降解?

实验使用的所有试剂耗材需经过去RNA酶处理。

Q2:RNA pull-down一定要体外转录合成RNA探针吗?

体外转录只是获得RNA的一种方式, 相比化学合成纯度更高。所以pull-down实验一般是体外转录得到目的RNA。当目的RNA序列大于2000bp时体外转录就不太容易转录成功, 这时我们可以设计合成一小段目的RNA探针, 通过探针与目的RNA结合, 再与蛋白结合, 便可绕过这个问题。

Q3:RNA在转录出来后, 其OD一般都不高, 可以使用吗?如何定量呢?

OD值不高可进行RNA纯化, 即便不纯化在实验中多加一些RNA亦可。而定量问题一般会进行琼脂糖凝胶电泳检测, 可以根据marker浓度来判断RNA的浓度。也可以用仪器测量RNA的浓度, 但通过体外转录得到的RNA浓度都能达到2 μ g/ μ L以上。并且pull-down实验不需要精确的定量, 都会加入过量的探针。

Q4:关于样本处理,细胞或者组织裂解时要不要加蛋白酶抑制剂或RNA酶抑制剂?还需要进行其他处理吗?操作过程中需要注意什么?

细胞裂解需要加入蛋白酶和RNA酶抑制剂,最好能够进行超声处理。另外裂解蛋白的全程尽量在冰上操作。

Q5:lncRNA引物设计有什么注意事项?或者说与普通的引物设计有什么区别?

体外转录扩增的引物只需要在正向引物5'端加入T7启动子序列即可。

Q6:想问下有推荐的银染试剂盒么?

赛默飞或者我们金开瑞的都可以。

Q7:质谱鉴定的蛋白主要是依据打分来进行筛选?这个筛选多少分算有效?

pull-down富集蛋白质谱分析后会剔除不可信蛋白,交付的都是可信蛋白,没有明确的打分。需要排序的话一般是根据鉴定蛋白特征性肽段的数目作为参考。

Q8:做lncRNApull down+质谱一般都会发现多个互作蛋白对吗?如何选择哪一种蛋白继续研究下去?

不同的RNA结合蛋白数量不等,根据实际鉴定的蛋白进行筛选;筛选的原则是根据自己研究的方向或相关功能确定这类蛋白。



武汉金开瑞生物工程有限公司

WUHAN GENE CREATE BIOLOGICAL ENGINEERING CO., LTD.

地址：武汉市东湖新技术开发区高新大道666号生物城创新园B4栋二楼

电话：027-87960366

邮箱：marketing@genecreate.com

网址：www.genecreate.cn

