

Animal RNA Pull-down Kit

货号：NR3131C

1. 产品介绍.....	1
2. 试剂盒操作流程图	2
3. 实验前准备	3
4. 试剂盒操作步骤	5
5. 产品注意事项.....	6
6. 常见问题.....	7

1. 产品介绍

本试剂盒为研究 RNA-蛋白质相互作用 (RNA-Protein Interaction, RPI) 提供高效、可靠的解决方案。该技术以目的 RNA 序列为中心，特异性捕获并鉴定与其相互作用的蛋白质。试剂盒以目的 RNA 片段为模板，合成生物素标记的特异性 RNA 探针。生物素标记的 RNA 探针通过高亲和力结合到预偶联在磁珠表面的链霉亲和素 (Streptavidin) 上。将固定有 RNA 探针的磁珠与含有潜在互作蛋白的提取液（如细胞裂解液）在适当条件下孵育，使目的 RNA 与其结合蛋白发生特异性结合，形成磁珠-链霉亲和素-生物素-RNA 探针-蛋白复合物。通过多次严格洗涤，有效去除未结合或非特异性结合的游离蛋白质及其他杂质。本试剂盒采用两种洗脱方式，变性洗脱和非变性/温和洗脱 可选）。洗脱得到的蛋白质可通过 Western Blot (WB) 验证特定目标蛋白，或通过质谱分析 (MS) 进行高通量鉴定。本产品可应用于动物细胞、组织等样品的 RNA 与蛋白结合的 RNA Pull down 实验，具体组分见表 1。

产品优势：

高特异性：链霉亲和素-生物素系统提供超高亲和力结合，确保探针高效固定与复合物稳定性。

高灵敏度：优化的缓冲体系与磁珠分离技术，有效富集低丰度互作蛋白。

操作便捷：基于磁珠分离技术，操作快速简单，易于实现高通量。

兼容性广：适用于多种样本来源（细胞、组织、植物等）的蛋白质提取液。

下游应用灵活：洗脱蛋白兼容 Western Blot 及质谱（MS）等高通量鉴定技术。

表 1. Animal RNA Pull-down Kit 组分

名称	12 Tests 规格	24 Tests 规格	储存条件
Streptavidin Magnetic Beads	500 µL	1 mL	4℃，1 年
Lysis Buffer	7 mL	14 mL	4℃，1 年
NT2 Buffer	15 mL	32 mL	4℃，1 年
RNA Structure Buffer	650 µL	1.3 mL	4℃，1 年
Wash Buffer	32 mL	64 mL	4℃，1 年
Elution Buffer	650 µL	1.3 mL	-20℃，1 年
Protease inhibitor	230 µL	460 µL	-20℃，1 年
RNase inhibitor	65 µL	130 µL	-20℃，1 年

请注意，本试剂盒不包含所有必需试剂/耗材，请参照清单另行准备：

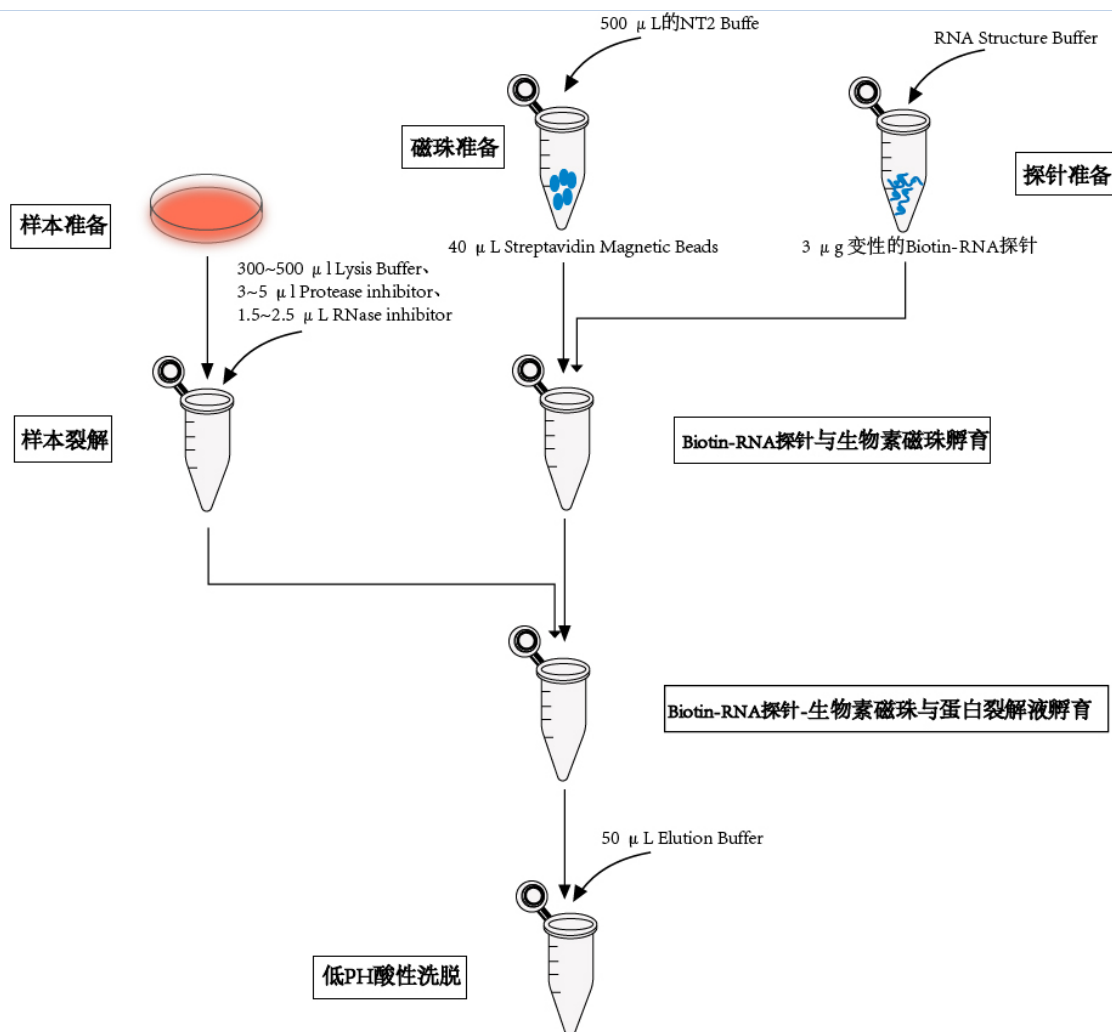
所需试剂：① RNA 探针；② PBS 缓冲液；③ RNase-free 水；④ RNA 纯化试剂盒（RNeasy Mini Kit）

所需仪器：① 超声仪（用于裂解样本）；② 低温离心机；③ 混匀仪；④ 磁力架；⑤ 无 RNase 的实验材

料：如离心管、枪头等。

** 注意：Biotin-RNA 探针可通过公司定制或自行制备,如需自行制备，制备方法可参考以下 3.2 的实验方法。*

2. 试剂盒操作流程图



3. 实验前准备

* 注意：以下样本收集量均为 1 组的建议用量，设计多组实验，样本量请按照实际使用量配置。如设计实验组和对照组，则需收集建议量的 2 倍，以此类推。

3.1 样本收集

3.1.1 贴壁细胞样本

吸净培养容器中的培养基，并加入 PBS 后用细胞铲将细胞刮入离心管中（或加入适量 PBS 清洗 1 次细胞后用胰酶消化细胞，加入血清终止反应后收集于离心管中），离心去掉上清，再加入 PBS 清洗细胞 2 次，离心后去除上清收集沉淀样本，每组细胞总量 $1 \sim 2 \times 10^7$ 个。

3.1.2 悬浮细胞样本

将细胞悬液转移至样品管中，离心弃掉上清。去除上清后用 PBS 清洗细胞 2-3 次，直至把所有的培养基去除

干净，每组细胞总量 1~2x10⁷ 个。

3.1.3 动物组织样本

组织离体 15 分钟内，立即将其用消毒过的刀具切成小块，用 PBS 或生理盐水洗净血液、体液等影响实验结果的残留成分，于液氮中进行充分研磨，每组样本量为 100~200 mg。

3.2 RNA 探针制备

3.2.1 实验试剂

- 目的基因质粒/PCR
- 正义链和反义链的 T7 引物
- 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)

3.2.2 实验方法

* 注意：由于 RNA 容易降解，建议在 RNA Pull down 实验当天或前一天进行体外转录实验。

(1) 根据目标 RNA 序列设计含 T7 启动子 (TAATACGACTCACTATAGGG) 的引物

探针类型	引物名称	引物序列
正义链探针	正义链-上游引物	5'- TAATACGACTCACTATAGGG+目的基因上游引物-3'
	正义链-下游引物	5'- 目的基因下游引物 -3'
反义链探针	反义链-上游引物	5'- 目的基因上游引物 -3'
	反义链-下游引物	5'- TAATACGACTCACTATAGGG+目的基因下游引物 -3'

(2) 以目的基因的质粒/PCR 产物为模板，PCR 分别获得 T7-正义链和 T7-反义链的 RNA 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。

(3) 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 Invitrogen 货号为 AM1344 的 T7 体外转录试剂盒 mMESSAGE mMACHINE® Kit 为例，配置以下体系：

组分	用量
10*Reaction Buffer	2 μ L
10*Biotin RNA labeling Mix	2 μ L
DNA 模板	0.5 μ g
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。

* 注意：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。

(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 μ L 对 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。

4. 试剂盒操作步骤

* 注意：以下操作均为 1 组用量，设计多组样本，试剂用量请按照实际使用量配置。如设计实验组和对照组，则为操作说明用量的 2 倍，以此类推。

4.1 蛋白提取

(1) 样本加入 300~500 μ L 预冷的 Lysis Buffer、3~5 μ L Protease inhibitor（按 1:100 添加）和 1.5~2.5 μ L RNase inhibitor（按 1:200 添加），吹打混匀。

- 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。

(2) 于 4 °C 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的无 RNase 离心管中，-80°C 保存。收集得到的样本可取 30 μ L 作为 input，剩余用于 RNA Pull down 实验。

* 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 μ g/ μ 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 μ 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，可提前摸索合适的条件。

4.2 漂洗液准备

取出 10 mL 离心管，加入 2.5 mL Wash Buffer、12.5 μ L Protease inhibitor（蛋白酶抑制剂与漂洗液按 1:200 添

加) 和 1.25 μL RNase inhibitor (RNase 抑制剂与漂洗液按 1:2000 添加), 混合均匀, 冰上保存, 现配现用。

4.3 磁珠准备

- a. 每组实验取 40 μL 的 Streptavidin Magnetic Beads 新的无 RNase 离心管中, 加入 500 μL 的 NT2 Buffer, 颠倒混匀 30 次, 放磁力架上静置 1 min 使磁珠全部吸附于磁力架, 弃上清。
- b. 再次加入 500 μL 的 NT2 Buffer, 颠倒混匀 30 次, 放磁力架上静置 1 min 使磁珠全部吸附于磁力架, 弃上清。
- c. 加入 200 μL 的 NT2 Buffer, 上下颠倒重悬磁珠。

4.4 RNA Pull down

- (1) 将 3 μg RNA 探针 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 RNA Structure Buffer, 室温放置 30 min。
- (2) 将 RNA 探针加入**步骤 4.3 制备**的磁珠中, 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 μL **步骤 4.2 制备**的漂洗液, 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**步骤 4.1 制备**的样本裂解液, 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 μL **步骤 4.2 制备**的漂洗液, 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。

4.5 洗脱

- (1) 加入 50 μL Elution Buffer, 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。

5. 产品注意事项

- 在进行实验设计时, 建议加入对照组, 方便后续实验结果分析。

-
- 请务必使用无 RNase 的实验材料：如离心管、枪头等。
 - 样本或蛋白量较少,可通过提高样本用量或更换和蛋白提取试剂盒进行蛋白提取。
 - 请勿使磁珠干燥、冷冻或剧烈涡旋，会导致磁珠聚集而降低结合能力。
 - 经煮沸后会导致磁珠聚集并且失去抗体结合能力，经煮沸的磁珠不应再次使用。
 - 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

6. 常见问题

Q: 获得的复合产物少的原因有哪些？怎么解决呢？

- (1) 样本或蛋白量较少,可通过提高样本用量或更换和蛋白提取试剂盒进行蛋白提取；
- (2) 孵育时间较短，可延长孵育时间，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；
- (3) RNA 探针量较少，可提高 RNA 探针用量

Q: 非特异结合蛋白较多，怎么解决呢？

要想减少非特异性的蛋白结合在磁珠上，可通过增加漂洗时间和次数来减少非特异结合。

Q：通过 pull-down 后银染验证发现，没有想要的目的条带？

- (1) 样品被蛋白酶降解,对应的策略是需要添加蛋白酶抑制剂,所有操作保持 4℃ 以下冰上操作并防止反复冻融。
- (2) 银染主要还是起到质控作用，以评估整个实验操作过程是否异常，比如评估拉下的复合体含量情况，不能决定质谱鉴定的结果，建议以质谱结果为准。