

## 说明书

## 生物素 RNA pull-down 试剂盒（植物）

## 产品信息

货号	产品名称	规格
FI8712-12T	生物素 RNA pull-down 试剂盒（植物）	12 次
FI8712-24T	生物素 RNA pull-down 试剂盒（植物）	24 次
FI8712-40T	生物素 RNA pull-down 试剂盒（植物）	40 次

## 产品描述

RNA pull-down 是检测 RNA 及其结合蛋白（RNA binding protein, RBP）之间相互作用的主要方法之一。辉骏生物生产的 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。

首先制备体外转录的生物素标记 RNA 作为探针，与样本裂解液孵育，RNA 探针与样本中的蛋白质结合形成复合物；链霉亲和素磁珠特异性捕获生物素标记的 RNA，同时实现对 RNA 结合蛋白（RBPs）的捕获富集；之后可以采用 Western Blot 技术检测特定蛋白，也可以采用质谱（LC-MS/MS）技术鉴定未知蛋白。

## 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	15 mL	30 mL	50 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	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：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）（可选）、PBS、RNase-free 水。
2. 所需仪器：磁力架（辉骏产品货号 FI7101）、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，请通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀瓶中磁珠。
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）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 $\mu$ g
10*Reaction Buffer	2 $\mu$ L
10*Biotin RNA labeling Mix	2 $\mu$ L
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，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) 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  $\mu\text{L}$  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. 总蛋白提取

- (1) 实验组和对照组一共取 0.4~0.6 g 植物组织，用 RNase-free 水清洗干净，置于研钵中，液氮充分研磨，转移粉末至新的无 RNase 离心管中；
- (2) 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，取 30  $\mu\text{L}$  作为 input，剩余上清平分为两份，记为实验组和对照组，-80 $^{\circ}\text{C}$  保存或直接用于 RNA pull down 实验。

**\* 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。根据经验，样本蛋白浓度通常不低于 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，总量约 2~3 mg。
- ii. 如果样本中目标蛋白丰度较低，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  $\mu\text{L}$  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) 将磁珠平分为两份，每组各约 200  $\mu\text{L}$ ，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  $\mu\text{L}$  ⑦蛋白酶抑制剂（按 0.5% 添加）和 2.5  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{g}$ , 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  $\mu\text{L}$  ④ RNA 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  $\mu\text{L}$  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  $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{L}$  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;
- (10) 每组加入 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;
- (11) 涡旋震荡 20 s, 1000 g 离心 20 s, 放磁力架上静置 1 min, 收集上清至新的无 RNase 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:** i. 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. 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)。

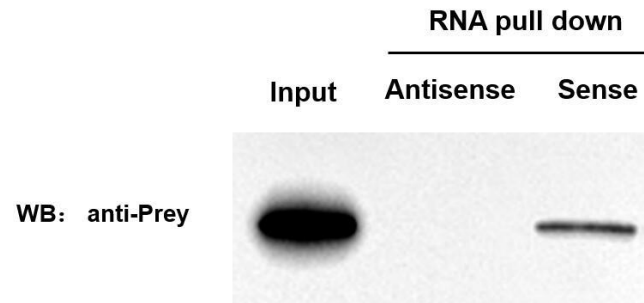
#### 问题解决

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

## 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