



TRAP试剂盒

Tagged RNA Affinity Purification(TRAP) Kit

注:本本产品干冰运输;试剂按说明书分别保存于4℃及-20℃,保质期12个月。

序号	试剂	货号及规格			储存
		IRR042 (6T)	IRR042M (12T)	IRR042L (24T)	
01	Lysis Buffer	10.5mL	21mL	42mL	4℃
02	GSH 磁珠	1.2mL	2.4mL	4.8mL	4℃
03	GSH 磁珠 Wash Buffer	12mL	24mL	48mL	4℃
04	NT2 Buffer	25.5mL	51mL	102mL	4℃
05	Protein Elution Buffer	0.36mL	0.72mL	1.44mL	4℃
06	RNA Elution Buffer	1.8mL	3.6mL	7.20mL	4℃
07	3M NaAc	0.24mL	0.48mL	0.96mL	4℃
08	Glycogen	12μL	24μL	48μL	4℃
09	RNase-free Water	0.36mL	0.72mL	1.44mL	4℃
10	Protease Inhibitor	0.1mL	0.2mL	0.4mL	4℃
11	RNase Inhibitor	30μL	60mL	0.12mL	4℃
12	DTT	0.11mL	0.21mL	0.42mL	4℃
13	DNase	0.12mL	0.24mL	0.48mL	4℃

14	DNase Salt Stock	6μL	12μL	24μL	4°C
15	Proteinase K	60μL	0.12mL	0.24mL	4°C

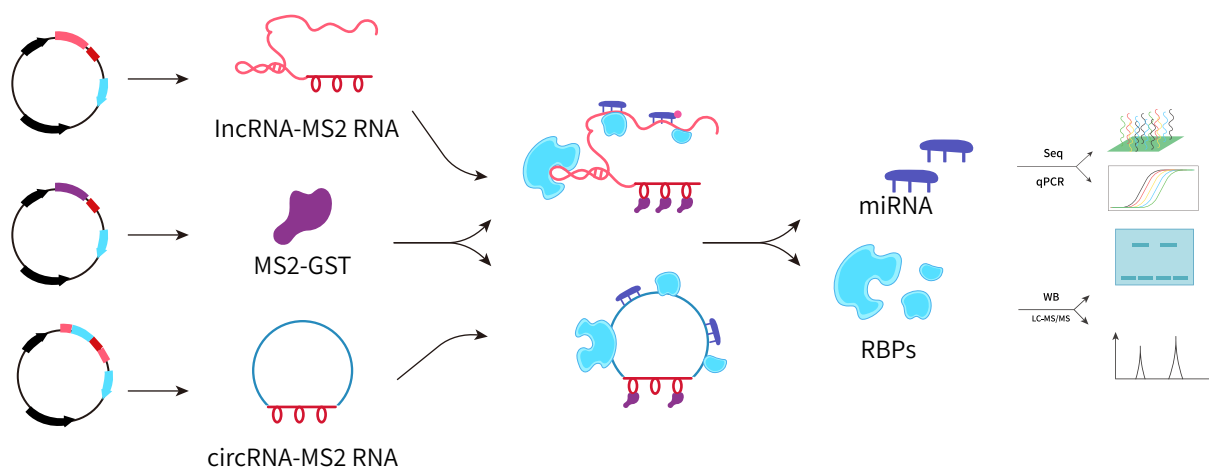
产品简介/Product Description

TRAP(Tagged RNA Affinity Purification) 是一种检测与 RNA 结合的蛋白质 (RBPs) 或 RNA 的研究方法。

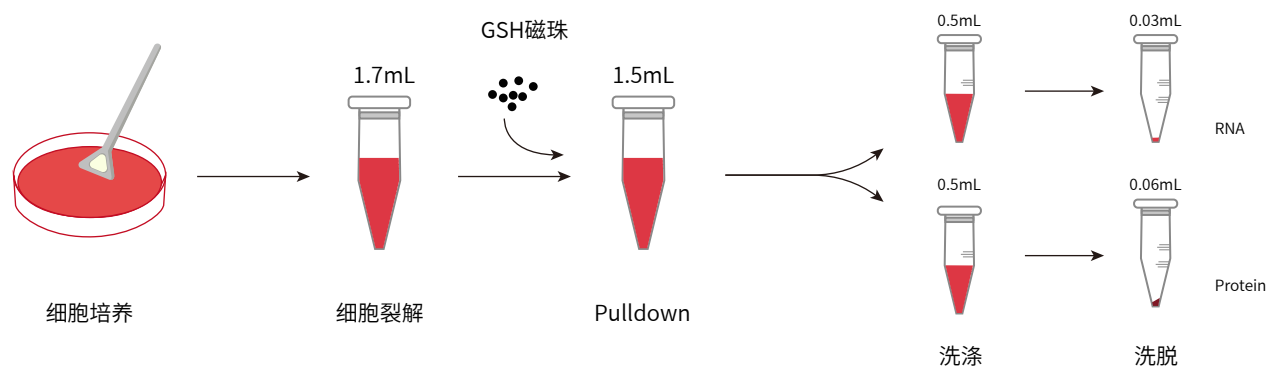
TRAP 方法首先通过设计 GST-MS2 融合表达载体和 ncRNA-MS2 茎环结构串联重复载体，共转细胞获得 GST-MS2 融合蛋白和 ncRNA-MS2 融合 RNA，在胞内形成 GST-MS2~ncRNA-MS2 与蛋白或 RNA 的复合体，最后裂解细胞，利用谷胱甘肽亲和和磁珠进行拉取，获得目的蛋白 -RNA 复合物，进一步分离纯化获得目的蛋白或目的 RNA 进行下一步检测分析。

技术路线/Technology mapping

1. 原理流程图



2. 实验操作流程图



使用流程/Procedure

1. 细胞培养与转染

- ①准备培养一皿 15cm 的培养皿，约为 1×10^7 细胞；
- ②共同转染 18 μ g MS2-ncRNA 质粒和 MS2 GST 质粒；若为 MS2-lncRNA 载体，则 MS2-lncRNA 质粒与 MS2 GST 质粒转染比例为 3:4，即一皿细胞需要转染 7.7 μ g MS2-lncRNA 质粒和 10.3 μ g MS2 GST 质粒。若为 MS2-circRNA 载体，则 MS2-circRNA 质粒与 MS2 GST 质粒转染比例为 1~2:1，即一皿细胞需要转染 9~12 μ g MS2-circRNA 质粒和 9~6 μ g MS2 GST 质粒。
- ③培养 48 小时后，用 PBS 洗涤细胞两次细胞样本。

注意：

1. 一皿 15 cm 培养皿的转染质粒载量约为 18~40 μ g，可以适当增加转染的质粒量，MS2-ncRNA 质粒和 MS2 GST 质粒按比例增加。
2. 细胞可以进行消化收集、洗涤后裂解，也可以直接在培养皿中洗涤后直接裂解。

2. 裂解物的制备

- ①细胞加入 1.7 mL Lysis Buffer，17 μ L Protease Inhibitor，5 μ L RNase Inhibitor，17 μ L DTT，在冰上裂解 10 分钟，期间摇动培养皿 3~5 次；
- ②待细胞充分裂解后，将细胞裂解液转移至无 RNA 酶的 EP 管中；
- ③4°C下，10,000 $\times$ g 离心裂解物 15 分钟；
- ④转移上清至无 RNA 酶的新管中；
- ⑤取 100 μ L 作为 Input RNA；
- ⑥取 100 μ L 作为 Input Protein；
- ⑦剩下 1.5mL 细胞裂解液作为实验组进行 Pulldown 实验。

3. Pulldown

- ①取 200 μ L GSH 磁珠 (10%)，磁力架上去除上清，用冰冷的 1 mL GSH 磁珠 Wash Buffer 洗涤 GSH 磁珠两次，每次置于垂直混匀器上温和旋转混匀 5 min，磁力架上去除上清，并加入 20 μ L Lysis Buffer 重悬，制成 50% 浆液，总体积约 40 μ L；
 - ②将上述重悬磁珠加入已准备好的实验组细胞裂解液中，4°C温和旋转孵育 3 小时；
 - ③样品置于磁力架上静置后去除上清，用 1 mL NT2 Buffer 洗涤珠子三次，每次置于 4°C，旋转洗涤 5 min，置于磁力架上去除上清；
 - ④向磁珠加入 20 μ L DNase I、1 μ L DNase Salt Stock、179 μ L NT2 Buffer，在 37°C下垂直温和混匀孵育 15 分钟，置于磁力架上去除上清；
 - ⑤加入 1 mL NT2 Buffer 旋转洗涤 5min；
- 若后续实验同时研究蛋白和 RNA，则 1 mL NT2 Buffer 平均分为两管，分别标记为 TRAP RNA 和 TRAP Protein，置于磁力架上去除上清。
- 若后续实验只研究蛋白，则 1 mL NT2 Buffer 按 100 μ L 及 900 μ L 分为两管，分别标记为 TRAPRNA 和 TRAP Protein，置于磁力架上去除上清。
- 若后续实验只研究 RNA，则 1 mL NT2 Buffer 按 900 μ L 及 100 μ L 分为两管，分别标记为 TRAPRNA 和 TRAP Protein，置于磁力架上去除上清。
- ⑥TRAP Protein、Input Protein 直接开展步骤 4,5，同时 RAP RNA、Input RNA 直接开展步骤 6,7。

注意：

1. RNA 按照序列每间隔 150~200bp 设计一条探针，制备探针组；
2. 探针（组）总浓度 $n \times 10$ pmol/ μ L；

3. 溶解后的探针 -20℃保存。

4. 100 μL beads/ 400pmol probes;

5. 默认配置 1T: 50μLbeads/200 pmol probes;

6. 以 n=5 条探针组为例，需加探针总量为 200pmol，对应磁珠 50μL;

4. RBPs 收集

①TRAP protein 组珠子加入 60 μL Protein Elution Buffer, 0.6 μL DTT, 37℃摇动 2h。磁力架上移上清至新离心管中;

②分别取 15 μL 蛋白样品开展 PAGE- 银染检测;

③分别取 15 μL 蛋白样品开展 PAGE-western blot 检测 (选做 1);

④分别取 30 μL 蛋白样品开展 LC-MS 检测 (选做 2);

⑤剩余样品 -80℃保存备用。

5. 银染

①取 15 μL 蛋白样品开展 PAGE 凝胶电泳;

②凝胶转移到固定液中, 浸泡至少 1 h, 期间换液 2-3 次;

③清水漂洗 30 min, 期间换水 3 次;

④准备溶液 A、B、C;

⑤凝胶浸入溶液 C, 温和振荡染色 15 min;

⑥去离子水漂洗、浸泡 2 min;

⑦准备溶液 D, 凝胶浸入溶液 D, 洗涤显色, 如条带显现或背景开始变为淡黄色, 终止反应;

⑧凝胶浸入 1% 乙酸终止反应;

⑨蒸馏水漂洗凝胶至少 1 h, 期间换水 3 次;

⑩凝胶水中或进行干胶保存。

6. RNA 纯化

①TRAP RNA 组珠子加入 200 μL RNA Elution Buffer, 5μL Proteinase K, Input RNA 加入 100 μL RNA Elution Buffer, 5 μL Proteinase K, 在 55℃下垂直旋转孵育 30 分钟;

②磁力架上移上清至新离心管中;

③分别加入等洗脱体积 (200 μL) 苯酚 - 氯仿 - 异戊醇混合液 (25:24:1), 涡旋混匀, 静置 5 min;

④13000 g, 4℃离心 10 分钟, 收集上层水相, 转移到新无 RNA 酶离心管中;

⑤在 200 μL 上清液中加入 500 μL 100%乙醇, 20 μL 3M NaAc 和 1 μL Glycogen, 颠倒混合;

⑥在 -20℃放置 2 小时或过夜后, 在 4℃下以 12,000×g 离心 20 分钟;

⑦用 500 μL 75%乙醇洗涤得到的 RNA 沉淀, 12,000×g, 4℃离心 10 分钟, 小心去除上清液;

⑧小心干燥 RNA 颗粒, 加入 30 μL RNase-free Water 溶解 RNA。

7. RNA 分析

①取 2μL RNA 样品 Agilent 2100 检测 RNA 浓度;

②参考逆转录试剂盒说明书逆转录 RNA 样品 (ncRNA-MS2 TRAP RNA、MS2 TRAP RNA、ncRNA-MS2 RNA Input、MS2 RNA Input 样品);

③参考 PCR 试剂盒配置反应体系进行 PCR, 取 3~5 μL PCR 产物 3% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果。

④参考 2×SYBR Green qPCR Mix 试剂盒说明书配置 20 μL PCR 扩增体系进行 qPCR, 然后进行数据分析, 得到富集效率; (选做 2)

⑤取 20 μL RNA 样品高通量测序技术检测 RNA 类型。(选做 3)

注意事项/Notes

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内；
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

