

RAP试剂盒-RNA Protein

RNA Antisense Purification (RAP) Kit for RNA and Protein

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

序号	试剂	货号及规格			储存
		IRR038 (6T)	IRR038M (12T)	IRR038L (24T)	
01	1.375 M Glycine	12 mL	24 mL	48 mL	4°C
02	lysis buffer	6 mL	12 mL	24mL	4°C
03	EDTA	60μL	0.12 mL	0.24mL	4°C
04	EGTA	30μL	60 mL	0.12 mL	4°C
05	2xHybridization Buffer	4.8 mL	9.6 mL	19.2 mL	4°C
06	Streptavidin Beads	0.3 mL	0.6 mL	1.2 mL	4°C
07	10 mM Tris-HClpH 7.5	9 mL	18 mL	36mL	4°C
08	1xHybridization Buffer	1.2 mL	2.4 mL	4.8 mL	4°C
09	Wash Buffer	21mL	42 mL	84mL	4°C
10	Protein Elution Buffer	0.36 mL	0.72 mL	1.44mL	4°C
11	RNA Elution Buffer	0.6 mL	1.2 mL	2.4mL	4°C
12	Proteinase K buffer	0.3 mL	0.6 mL	1.2mL	4°C
13	5M NaCl	60μL	0.12 mL	0.24mL	4°C

14	Glycogen	10μL	20μL	40μL	4°C
15	RNase-free water	0.36mL	0.72 mL	1.44mL	4°C
16	Protease inhibitor	60μL	0.12 mL	0.24mL	-20°C
17	RNase Inhibitor	30μL	60μL	0.12 mL	-20°C
18	DNase salt stock	30μL	60μL	0.12mL	-20°C
19	DNase	60μL	0.12mL	0.24mL	-20°C
20	DTT	60μL	0.13mL	0.26mL	-20°C
21	Proteinase K	20μL	50μL	100μL	-20°C

产品简介/Product Description

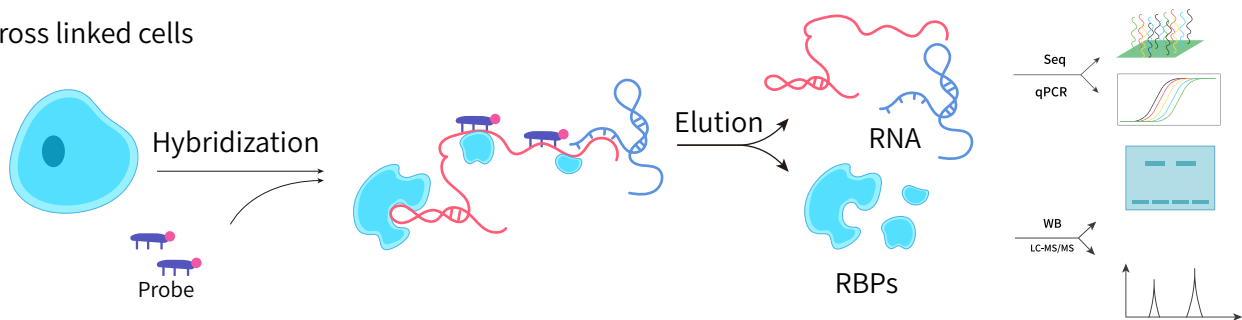
RNA 反义纯化技术（RNA Antisense Purification, RAP）运用于研究 RNA 与 RNA 及蛋白质之间相互作用的实验。根据研究对象不同，RAP 技术结合了高通量测序（RAP-Seq）和质谱技术（RAP-MS）分别研究与目标 RNA 互作的基因和蛋白质。

RAP 技术是通过设计生物素探针组，把目标 RNA 拉下来以后，与其共同作用的 RNA 或蛋白质（RBPs）就会附在磁珠上，最后把基因做高通量测序，这样会得到该调控 RNA 转录调控的下游靶基因。与此同时，RBPs 可以开展 WesternBlot 验证或者 MS 鉴定未知蛋白。

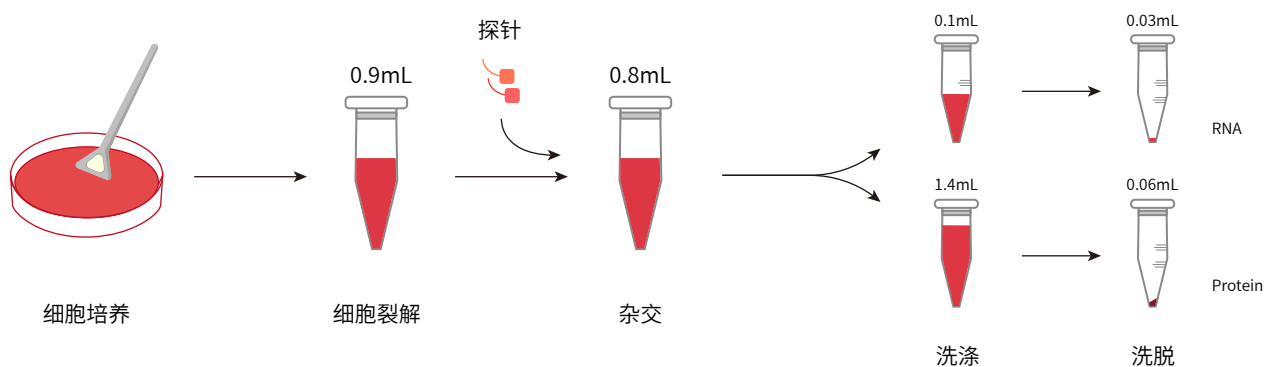
技术路线/Technology mapping

1. 原理流程图

Cross linked cells



2. 实验操作流程图



使用流程/Procedure

1. 细胞 / 组织样品前处理

细胞样本：

- ① 收集 2×10^7 细胞，加入 10 mL PBS 洗涤细胞，室温 1000 rpm 离心 5 min 收集细胞弃上清；
- ② 2×10^7 细胞加入 20 mL $1 \times$ PBS (包含 0.54 mL 37% 甲醛，甲醛终浓度 1%) 重悬细胞，垂直混匀器室温交联 10 min；
- ③ 加入 2 mL 1.375 M Glycine (或 0.2 g Glycine)，垂直混匀器室温中和 5 min；
- ④ 4°C ，1500 rpm，离心 5 分钟收集细胞，弃上层 PBS 溶液；
- ⑤ 加入 10 mL 预冷的 $1 \times$ PBS，洗涤两次细胞，每次 4°C ，1000 rpm 离心 5 分钟，弃上清，收集细胞。

组织样本：

- ① 新鲜组织 0.2 g：使用剪刀充分剪碎至 1 mm^3 体积，加入 20 mL $1 \times$ PBS (含 0.54 mL 37% 甲醛，甲醛终浓度 1%)，垂直混匀器室温交联 20 min；

深低温保存的冻存组织 0.2 g：直接用液氮研磨至均匀粗粉，加入 20 mL $1 \times$ PBS (含 0.54 mL 37% 甲醛，甲醛终浓度 1%)，垂直混匀器室温交联 20 min；

- ② 加入 2 mL 1.375 M Glycine，垂直混匀器室温中和 5 min，结束后置于冰上；
- ③ 4°C ，1500 rpm，离心 5 分钟收集细胞，弃上层 PBS 溶液；
- ④ 加入 10 mL 预冷的 $1 \times$ PBS，洗涤两次组织，每次 4°C ，1000 rpm 离心 5 分钟收集组织；
- ⑤ 匀浆器冰上充分匀浆组织，用 $100\mu\text{m}$ 过滤收集细胞悬液，可加少量 $1 \times$ PBS 冲洗；
- ⑥ 1500 rpm、 4°C 离心 5 分钟，弃上清，收集细胞；
- ⑦ 用 PBS 重悬细胞，1100 g、 4°C 离心 5 分钟，弃上清，收集细胞。
- ⑧ 细胞沉淀中加入 1 mL 预冷的 lysis buffer、 $10\mu\text{L}$ protease inhibitor、 $5\mu\text{L}$ RNase Inhibitor，并充分吹打，冰上充分裂解 10 min。

注意：

1. 每次实验至少需要 2×10^7 细胞量；
2. 目的基因表达量的 CT 值与内参 GAPDH 的差值小于 12，若差值大于 12，则需要加大细胞量，超出 12 的部分每多出一个 CT 值，增加一倍细胞量；
3. 甲醛必须新鲜；
4. 建议 1×10^7 细胞使用 10 mL PBS (含 1% 甲醛) 交联细胞；
5. 最后一次充分去除干净残余 PBS；
6. 交联后样品可经液氮速冻， -80°C 保存；

2. DNA 的去除

- ① 细胞裂解液添加 $5\mu\text{L}$ DNase salt stock、 $10\mu\text{L}$ DNase (10 U)， 37°C 温育 10 min；
- ② 转移样品到冰浴环境，快速加入 $10\mu\text{L}$ EDTA、 $5\mu\text{L}$ EGTA、 $10\mu\text{L}$ DTT 并充分
- ③ 将细胞裂解液按 0.8 mL、0.1 mL 及 0.1 mL 五管分别为 (标示 RAP、Input protein 及 Input RNA)；
- ④ RAP 组加入等体积 $2 \times$ Hybridization Buffer，充分混匀后冰上静置 10 min；
- ⑤ 4°C ，16,000 g 离心 10 min 转移上清至新无 RNase 离心管中；
- ⑥ Input protein 及 Input RNA 样品 -80°C 保存备用。

3. 探针准备

- ① 探针第一条，加入 100 倍 nmol 数 μL DEPC 水，充分涡旋混匀后微离心后转移到第二管，以此类推溶解每组探针；若只有一条探针，则直接加入 100 倍 nmol 数 μL DEPC 水，充分涡旋混匀后微离心；
- ② 取 $4\mu\text{L}$ 探针 (组) 溶液 (即 40 pmol 探针 / 条 / 0.8 mL 样品，探针总量为 $n \times 40\text{ pmol}$)；
- ③ 85°C 变性 3 分钟后，快速转移冰浴。

- 注意：1. circRNA 以接头序列设计一条探针；
2. 其他类型 RNA 按照序列每间隔 150~200bp 设计一条探针，制备探针组；
3. 探针（组）总浓度 $n \times 10 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ ；

4. 磁珠准备

- ①按 $n(\text{探针数目}) \times 10 \mu\text{L}$ 链霉亲和素磁珠标准，为 RAP 组准备 $50 \mu\text{L}$ Streptavidin Beads（以探针组含有五条探针为例），磁力架收集磁珠并去上清；
- ②加入 $0.5 \text{ mL } 10 \text{ mM Tris-HCl (pH 7.5)}$ 充分重悬后，颠倒混匀 10 次，磁力架收集磁珠并去上清；
- ③重复步骤②两次；
- ④加入 $0.2 \text{ mL } 1 \times \text{Hybridization Buffer}$ 充分重悬后，颠倒混匀 10 次，待用，用时磁力架收集磁珠并去上清。

注意：

1. $100 \mu\text{L beads}/400 \text{ pmol probes}$ ；
2. 默认配置 1T: $50 \mu\text{L beads}/200 \text{ pmol probes}$ ；
3. 以 $n=5$ 条探针组为例，需加探针总量为 200 pmol ，对应磁珠 $50 \mu\text{L}$ ；

5. 杂交与捕获

- ①将 RAP 样品在垂直混匀器上 65°C 温育变性 10 min，将探针组加到变性样品中， 37°C 杂交 30 min， 50°C 温育变性 5 min， 37°C 杂交 90~180 min；
- ②将 RAP 样品 - 探针组样品加入到准备好的磁珠中，室温垂直混匀器上温育结合 30 min；③磁力架收集磁珠并去上清；
- ④加入 $500 \mu\text{L}$ Wash Buffer， 37°C 摇动洗涤 2~4 min 后磁力架收集磁珠并去上清；
- ⑤重复步骤④三次；
- ⑥加入 $1.5 \text{ mL } 37^\circ\text{C}$ 预热 wash buffer，按 $100 \mu\text{L}$ 及 $1400 \mu\text{L}$ 分装，分别标示 RAP RNA、RAP Protein，磁力架收集磁珠并去上清。RAP Protein 样品直接开展步骤 6；同时 RAP RNA 样品直接开展步骤 7，8，9，10。

6. 蛋白提取纯化

- ①RAP Protein 样品加入 $60 \mu\text{L}$ Protein Elution Buffer、 $0.6 \mu\text{L}$ DTT 充分混匀， 37°C 摇动 2 h；
- ②磁力架收集磁珠并转移上清至新离心管中。
- ③取 $15 \mu\text{L}$ 蛋白样品开展 PAGE- 银染检测；(option one)
- ④取 $15 \mu\text{L}$ 蛋白样品开展 PAGE-western blot 检测；(option two)
- ⑤银染和 western blot 上样前，按常规操作，蛋白样品加入 $5 \times \text{Loading buffer}$ 稀释至 $1 \times$ ，沸水浴 10 min 后置于冰上或 -20°C 保存。
- ⑥取 $30 \mu\text{L}$ 蛋白样品开展 LC-MS 检测；(option three)
- ⑦剩余样品 -20°C 保存备用；

7. RNA 提取纯化

- ① RAP RNA 样品磁珠加入 $50 \mu\text{L}$ RNA Elution Buffer 充分混匀后， 95°C 加热 2 min；
- ②磁力架收集磁珠并转移上清至新无 RNase 离心管中，重复步骤①一次，合并上清；
- ③RAP RNA 和 Input RNA 样本加入 $25 \mu\text{L}$ $5 \times \text{Proteinase K buffer}$ 、 $2 \mu\text{L}$ proteinase K；
- ④ 55°C 温育消化 1 h；
- ⑤加入等洗脱体积 ($125 \mu\text{L}$) 苯酚 - 氯仿 - 异戊醇混合液 (25:24:1) 到 RAP RNA 和 Input RNA 样品，颠倒混匀 15 秒；
- ⑥ 13000 g ， 4°C 离心 10 分钟，收集上层水相，转移到新无 RNA 酶离心管中；
- ⑦加入 $5 \mu\text{L}$ 5 M NaCl 、 $1 \mu\text{L}$ Glycogen、 $312.5 \mu\text{L}$ 无水乙醇，充分颠倒混匀后 -80°C 沉淀 1~16 小时；
- ⑧ 4°C ， 16100 g 离心 30 分钟，弃上清；
- ⑨加入 1 mL 预冷的 80% 乙醇， 4°C 16100 g 离心 10 分钟，弃上清，室温静置风干 10 分钟；
- ⑩加入 $30 \mu\text{L}$ RNase-free water 溶解 RNA 沉淀；RNA 样品置于 -80°C 保存备用。

7. RNA 分析

- ①取 2 μ L 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（RAP RNA 和 Input RNA 样品）；
- ③参考 PCR 试剂盒配置反应体系进行 PCR，取 3~5 μ L PCR 产物 3% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果；（option one）
- ④参考 2 $\times$ SYBR Green qPCR Mix 试剂盒说明书配置 20 μ L PCR 扩增体系进行 qPCR，然后进行数据分析，得到富集效率；（option two）。

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。

