

CircRNA pull down试剂盒

CircRNA pull-down Kit

注: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
		IRR007 (6T)	IRR007M (12T)	IRR007L (40T)	
01	磁珠	0.25mL	0.5mL	1 mL	4℃
02	裂解缓冲液	3.5 mL	7mL	14 mL	4℃
03	NT2缓冲液	13 mL	26 mL	52 mL	4℃
04	漂洗液	16 mL	32 mL	64 mL	4℃
05	洗脱缓冲液	0.33 mL	0.65 mL	1.3 mL	-20℃
06	蛋白酶抑制剂	0.12 mL	0.23 mL	0.46 mL	-20℃
07	RNase 抑制剂	35 μ L	70 μ L	0.14 mL	-20℃
08	F2配体	0.13 mL	0.25 mL	0.5 mL	-20℃

产品简介/Product Description

circRNA Pull-Down 试剂盒,利用“F2 标签”与其特异性配体的强亲和力,高效调取细胞中的目标 circRNA 及其结合蛋白或结合 RNA。F2 标签是一段短的 RNA 序列,与目标 circRNA 连接后,几乎不影响其结构和功能。

实验前先将 F2 标签序列与目标 circRNA 序列连接,构建成 F2-circRNA 过表达载体,转染并裂解目的细胞,之后采用特异性配体磁珠来调取 F2-circRNA 及其结合蛋白或结合 RNA。去除未结合的物质后,洗脱蛋白质或提取 RNA 进行检测。

使用流程/Procedure

1. 细胞 / 组织样品前处理

- ①实验组和对照组各取 2×10^7 个细胞，用预冷的 PBS (RNase-free) 清洗细胞 2~3 次，每次 4°C 500 g 离心 5 min 收集细胞沉淀，彻底去除培养基成分；
- ②将样本置于冰上，每组加入 500 μL 预冷的裂解缓冲液、5 μL 蛋白酶抑制剂（按 1% 添加）和 2.5 μL RNA 酶抑制剂（按 0.5% 添加），吹打混匀；
- ③为了更充分裂解，最好冰上超声至溶液基本澄清；如果无超声条件，可置于冰上裂解 30 min，期间每 10min 涡旋混匀一次，每次 5 s；
- ④ 4°C 12000g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中；
- ⑤ 取 30 μL 作为 input，剩余置于冰上备用或 -80°C 保存。

注意：1. 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。

2. 如果样本中目标蛋白或 RNA 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. F2 配体磁珠制备

- ①将磁珠上下颠倒混匀，取实验组和对照组一共所需的 80 μL 磁珠到新的离心管中；
- ②加入 1mL NT2 缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1min 并弃上清；
- ③重复上步操作 1 次；
- ④加入 400 μL NT2 缓冲液，上下颠倒重悬磁珠；
- ⑤加入 40 μL F2 配体，混匀仪上室温孵育 30min；
- ⑥放磁力架上静置 1min 并弃上清；
- ⑦加入 1mL NT2 缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1min 并弃上清；
- ⑧重复上步操作一次；
- ⑨加入 600 μL NT2 缓冲液，上下颠倒重悬磁珠，将磁珠平分为两份，每组各约 300 μL ，转移到新的离心管中，记为实验组和对照组。

3. 漂洗液准备

取 10 mL 离心管，加入实验组和对照组总共所需的 5mL 漂洗液、25 μL 蛋白酶抑制剂（按 0.5% 添加）和 2.5 μL RNase 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. circRNA pull-down

- ①将细胞裂解液加入相应组别的磁珠中，混匀仪上 4°C 孵育 2~4 h；
- ②放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- ③每组加入 500 μL 漂洗液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1min 并弃上清；
- ④重复上步操作两次，共漂洗三次，保留磁珠。

5. 蛋白洗脱（选做）

如果需要对 pull down 产物进行蛋白检测，可以在以下方案中选择合适的洗脱方法：

- ①非变性洗脱法：向磁珠中加入 50 μL 洗脱缓冲液，涡旋震荡 20 s，混匀仪上室温洗脱 10 ~ 15 min；涡旋震荡 20s，1000g 离心 20s；放磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中， -80°C 保存。该洗脱产物保持原有的生物活性，适用于后期各种检测，例如质谱、SDS-PAGE 或 Western-blot 等。
- ②SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法（变性洗脱法）：向磁珠中加入 50 μL 1 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液， 95°C 加热 5 min；磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中。该洗脱产物适用于 SDS-PAGE 或 Western Blot 检测；如果需要进行质谱检测，则切胶条后送检。

注意：

1. 本试剂盒提供的洗脱缓冲液可以兼容质谱。
2. 如果选择非变性洗脱法，可以暂时保留洗脱后的磁珠，当非变性洗脱效率较低时，则采用 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法继续洗脱蛋白。
3. 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，染色步骤参考如下：（为了便于称量，每步配置的溶液体积较大，实际操作时取适量溶液浸泡胶即可）
 - ①固定：30 min（乙醇：乙酸：水=4：1：5 体积比）；
 - ②敏化：30 min（乙酸钠 10.2g，硫代硫酸钠 0.471 g，乙醇 45mL，加水至 150mL）；
 - ③水洗：4 次，每次 10min；
 - ④银染：30 min（硝酸银 0.375 g，加水至 150mL）；
 - ⑤水洗：2 次，每次 40 s；
 - ⑥显色：显影至条带清楚（碳酸钠 3.75 g，60μL 甲醛，加水至 150mL）；
 - ⑦终止：5min（Na₂ EDTA 2.19 g，加水至 150 mL）。

6. RNA 提取纯化（选做）

如果需要对 pull down 产物进行 RNA 检测，按照以下步骤提取 RNA。

- ①向磁珠中加入 1 mL Trizol，室温静置 5 min，4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清；
- ②加入 0.2 mL 氯仿，涡旋混匀或剧烈晃动 15 s，室温放置 2 ~ 3 min；
- ③4℃ 12000g 离心 15 min，吸取水相至新的无 RNase 离心管中（约可吸取 0.5-0.55 mL）；
- ④加入 0.5 mL 异丙醇，颠倒数次混匀，室温下沉淀 10 min 或 -20℃ 沉淀过夜；
- ⑤4℃ 12000g 离心 10 min，管底可见 RNA 沉淀，弃上清；
- ⑥加入 1 mL 75% 乙醇（DEPC 水或 RNase-free 水配制）；
- ⑦4℃ 12000g 离心 10 min，弃上清；5000g 快速离心 1s，小心吸尽液体；
- ⑧待 RNA 略干后，加入 20 μL DEPC 水或 RNase-free 水或溶解，-80℃ 保存或直接进行反转录。取 40 uL Protein A/G 磁珠，加入 500μL IP buffer 3，轻轻吹打混匀后置于磁力架上吸附磁珠，去除上清；

注意：

1. Pull down 后的 RNA 一般较微量，操作时注意勿把 RNA 沉淀吸走；
2. 切勿让 RNA 过分干燥，否则将极难溶解，且测出的 A260/280 值会低于 1.6。本试剂盒提供的洗脱缓冲液可以兼容质谱。

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。

