

## F2-RNA pull down试剂盒(植物)

F2-RNA pull-down Kit for Plant

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   |
|----|-----------|----------------|------------------|------------------|------|
|    |           | IRR005<br>(6T) | IRR005M<br>(12T) | IRR005L<br>(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    | 16 mL          | 32 mL            | 64 mL            | 4℃   |
| 04 | RNA结构缓冲液  | 0.38 mL        | 0.65 mL          | 1.3 mL           | 4℃   |
| 05 | 漂洗液       | 16 mL          | 32 mL            | 64 mL            | 4℃   |
| 06 | 洗脱缓冲液     | 0.33 mL        | 0.65 mL          | 1.3 mL           | -20℃ |
| 07 | 蛋白酶抑制剂    | 0.12 mL        | 0.23 mL          | 0.46 mL          | -20℃ |
| 08 | RNase 抑制剂 | 35 $\mu$ L     | 70 $\mu$ L       | 0.14 mL          | -20℃ |
| 09 | F2配体      | 0.13 mL        | 0.25 mL          | 0.5 mL           | -20℃ |

### 产品简介/Product Description

F2-RNA 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目标 RNA 及其结合蛋白。F2 标签是一段短 RNA 序列,与目标 RNA 连接后,几乎不影响其结构和功能,可以用于体内或体外标记各种类型的 RNA (如 mRNA、lncRNA、circRNA 等)。

# 使用流程/Procedure

## 1. 细胞 / 组织样品前处理

- ①200~300 mg 植物组织用 RNase-free 水清洗干净，液氮充分研磨
- ②样本加入 300~500 $\mu$ L 预冷的裂解缓冲液、3~5  $\mu$ L 蛋白酶抑制剂（按 1:100 添加）和 1.5~2.5  $\mu$ L RNA 酶抑制剂（按 1:200 添加），吹打混匀。
- ③冰上超声破碎至溶液基本澄清。
- ④4 $^{\circ}$ C 12000 g 离心 15min，收集上清至新的离心管中；取 30  $\mu$ L 作为 input，剩余用于 RNA pull-down 实验，-80 $^{\circ}$ 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每组实验取 40  $\mu$ L 磁珠，加入 500  $\mu$ L NT2 缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- ②再次加入 500  $\mu$ L NT2 缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- ③加入 200  $\mu$ L NT2 缓冲液，上下颠倒重悬磁珠。
- ④加入 20  $\mu$ L F2 配体，混匀仪上室温孵育 30 min，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- ⑤加入 500  $\mu$ L NT2 缓冲液，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。
- ⑥加入 300  $\mu$ L NT2 缓冲液，上下颠倒重悬磁珠。

## 3. 漂洗液准备

取 10 mL 离心管，加入本次实验 2 组样本（实验组 + 对照组）所需的漂洗液、蛋白酶抑制剂（按 1:200 添加）和 RNase 抑制剂（按 1:2000 添加），混合均匀，冰上保存，现配现用。例如：体外 F2-RNA pull-down 取 5 mL 漂洗液加 25 $\mu$ L 蛋白酶抑制剂，2.5 $\mu$ L RNase 抑制剂；体内 F2-RNA pull-down 取 3 mL 漂洗液加 15 $\mu$ L 蛋白酶抑制剂，1.5 $\mu$ L RNase 抑制剂。

## 4. RNA pull-down

### 方案 1：体外 F2-RNA pull-down

- ①1.5  $\mu$ L 取 3  $\mu$ g RNA 探针，95 $^{\circ}$ 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  $\mu$ L RNA 结构缓冲液和 1 $\mu$ L RNase 抑制剂，室温放置 30 min。
- ②将 RNA 探针加入磁珠中，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 $\mu$ L 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加入样本裂解液，放混匀仪上 4 $^{\circ}$ C 孵育 2~4 h；放磁力架上静置 1min 并弃上清。
- ⑤加入 500 $\mu$ L 漂洗液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1min 并弃上清；重复该漂洗操作两次。
- ⑥加入 50 $\mu$ L 洗脱缓冲液，涡旋震荡 20 s，放混匀仪上室温洗脱 10~15 min，涡旋震荡 20 s。
- ⑦1000 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 $^{\circ}$ C 保存，或直接用于 Western blot、银染 SDS-PAGE 或质谱实验。取实验组和对照组 RNA 探针各 3  $\mu$ g，95 $^{\circ}$ C 变性 3min，冰浴 1min，短暂离心甩下管壁液体，向管中加入 50  $\mu$ L RNA 结构缓冲液，室温放置 30 min；

### 方案 2：体内 F2-RNA pull-down

- ①将样本裂解液加入磁珠中，放混匀仪上 4 $^{\circ}$ C 孵育 2~4 h，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- ②加入 500  $\mu$ L 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。
- ③加入 50 $\mu$ L 洗脱缓冲液，涡旋震荡 20 s，放混匀仪上室温洗脱 10~15 min，涡旋震荡 20 s。

④1000 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℃保存。

## 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 50μL 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 1min, 收集上清至新的离心管中, -80℃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 50μL 1×SDS-PAGE 上样缓冲液, 95℃加热 5 min; 磁力架上静置 1min, 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: 30min (乙醇: 乙酸: 水 =4: 1: 5 体积比);

②敏化: 30min (乙酸钠 10.2 g, 硫代硫酸钠 0.471g, 乙醇 45mL, 加水至 150mL);

③水洗: 4 次, 每次 10min;

④银染: 30min (硝酸银 0.375g, 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 150 mL);

⑦终止: 5min (Na<sub>2</sub>EDTA 2.19 g, 加水至 150mL)。

## 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 1mL Trizol, 室温静置 5min, 4℃ 12000g 离心 10min, 取上清;

②加入 0.2 mL 氯仿, 涡旋混匀或剧烈晃动 15s, 室温放置 2 ~ 3min;

③4℃ 12000g 离心 15min, 吸取水相至新的无 RNase 离心管中 (约可吸取 0.5-0.55mL);

④加入 0.5 mL 异丙醇, 颠倒数次混匀, 室温下沉淀 10min 或 -20℃沉淀过夜;

⑤4℃ 12000g 离心 10min, 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 10min, 弃上清; 5000g 快速离心 1s, 小心吸尽液体;

⑧待 RNA 略干后, 加入 20μL DEPC 水或 RNase-free 水或溶解, -80℃保存或直接进行反转录。取 40uL 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。

