

F2-RNA pull down试剂盒(动物)

F2-RNA pull-down Kit for Mammal

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
		IRR004 (6T)	IRR004M (12T)	IRR004L (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 μ L	70 μ 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

- ①组织: 100~200 mg 组织用冷 PBS (RNase-free) 清洗干净, 彻底去除血液等成分, 液氮充分研磨; 细胞样本: $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ 个细胞用冷 PBS 漂洗 2~3 次, 彻底去除培养基成分, 4°C 500 g 离心 5 min 收集沉淀。
- ②样本加入 300~500 μL 预冷的裂解缓冲液、3~5 μL 蛋白酶抑制剂 (按 1:100 添加) 和 1.5~2.5 μL RNA 酶抑制剂 (按 1:200 添加), 吹打混匀。
- ③细胞: 置于冰上裂解 30 min (间隔手动混匀); 为了更充分裂解, 也可以冰上超声至溶液基本澄清; 组织: 最好冰上超声破碎至溶液基本澄清, 也可以置于冰上裂解 30 min (间隔手动混匀)。
- ④ 4°C 12000 g 离心 15 min, 收集上清至新的离心管中; 取 30 μL 作为 input, 剩余用于 RNA pull-down 实验, -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每组实验取 40 μL 磁珠, 加入 500 μL 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 μL 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 μL NT2 缓冲液, 上下颠倒重悬磁珠。
- ④加入 20 μL 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 μL 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 μL 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 μL 蛋白酶抑制剂, 2.5 μL RNase 抑制剂; 体内 F2-RNA pull-down 取 3 mL 漂洗液加 15 μL 蛋白酶抑制剂, 1.5 μL RNase 抑制剂。

4. RNA pull-down

方案 1: 体外 F2-RNA pull-down

- ①1.5 μL 取 3 μg RNA 探针, 95°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 μL RNA 结构缓冲液和 1 μL 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 μL 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°C 孵育 2~4 h; 放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- ⑤加入 500 μL 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。
- ⑥加入 50 μL 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°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 μg , 95°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 μL 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°C 孵育 2~4 h, 放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- ②加入 500 μL 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 μ 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。

④ 1000 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 50 μ L 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℃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。

② SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法（变性洗脱法）：向磁珠中加入 50 μ L 1×SDS-PAGE 上样缓冲液，95℃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 10.2 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 3.75 g，60 μ L 甲醛，加水至 150 mL）；

⑦ 终止：5 min（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，涡旋混匀或猛烈晃动 15 s，室温放置 2 ~ 3 min；

③ 4℃ 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；

⑤ 4℃ 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）；

⑦ 4℃ 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 μ L DEPC 水或 RNase-free 水或溶解，-80℃保存或直接进行反转录。取 40 μ L Protein A/G 磁珠，加入 500 μ L 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。

