

# RNA pull-down assay Kit

## RPD 试剂盒说明书

### KT103-01 系列：不带阳性对照体系

Cat. No. KT103-0101 (12 rxns)

Cat. No. KT103-0102 (24 rxns)

Cat. No. KT103-0103 (48 rxns)

### KT103-02 系列：包含阳性对照体系

Cat. No. KT103-0201 (12 rxns)

Cat. No. KT103-0202 (24 rxns)

Cat. No. KT103-0203 (48 rxns)

按试剂标签提示分开储存

For research use only, not intended for diagnostic testing.

## 产品简介:

RNA pull-down 技术检测 RNA 结合蛋白与其靶 RNA 之间相互作用的主要实验手段之一。本产品适用于大部分的动物细胞和组织的 RNA pull-down 实验。

## 试剂盒包装组分:

表 1 KT103-01 试剂盒包装组分信息

室温保存试剂				
编号	试剂	数量(12 rxns)	数量(24 rxns)	数量(48 rxns)
SCRPD-1	Cell lysis buffer	10mL	20mL	40mL
SCRPD-2	Binding buffer	65mL	130mL	260mL
SCRPD-3	Wash buffer	150mL	300mL	600mL
4℃保存试剂				
SCRPD-4	SA-链霉亲和素磁珠	650uL	1.3mL	2.6mL
-20℃保存试剂				
SCRPD-5	蛋白酶抑制剂	120uL	240uL	480uL
SCRPD-6	PMSF	150uL	290uL	580uL
SCRPD-7	RNase inhibitor	65uL	130uL	260uL
SCRPD-8	5x SDS Loading buffer	200uL	360uL	720uL

表 2 KT103-02 阳性试剂盒包装组分信息

室温保存试剂				
编号	试剂	数量(12 rxns)	数量(24 rxns)	数量(48 rxns)
SCRPD-1	Cell lysis buffer	10mL	20mL	40mL
SCRPD-2	Binding buffer	65mL	130mL	260mL
SCRPD-3	Wash buffer	150mL	300mL	600mL
4℃保存试剂				
SCRPD-4	SA-链霉亲和素磁珠	650uL	1.3mL	2.6mL
-20℃保存试剂				
SCRPD-5	蛋白酶抑制剂	120uL	240uL	480uL
SCRPD-6	PMSF	150uL	290uL	580uL
SCRPD-7	RNase inhibitor	65uL	130uL	260uL
SCRPD-8	5x SDS Loading buffer	200uL	360uL	720uL
阳性对照体系: (-20℃保存)				
SCRPD-9	阳性对照探针 AR+	3ug	6ug	12ug
SCRPD-10	阴性对照探针 AR-	3ug	6ug	12ug
SCRPD-11	HUR 抗体 (兔抗, abcam, Ab200342)	10uL, 足够检测 4-5 个 WB	20uL, 足够检测 8-10 个 WB	40uL, 足够检测 20 个 WB

**注:** 对照组与实验组消耗试剂量相同, 一次实验含 Input 组、目的探针组、阴性对照组, 要消耗 2 rxns 试剂量。

## 实验前准备

### 细胞准备

#### A 动物组织处理:

细胞量: 约  $1-2 \times 10^7$  个

动物组织经过组织匀浆或液氮研磨后, 去除大颗粒组织后用 PBS 重悬细胞, 清洗 2-3 次, 3000rpm 离心 3min, 去除上清后  $-80^{\circ}\text{C}$  保存或继续进行实验。

注: 尽量将上清液彻底吸干再保存。

#### B 动悬浮细胞交联:

细胞量: 约  $1-2 \times 10^7$  个

悬浮细胞培养之后连同培养液收集到离心管中, 3000rpm 离心收集细胞沉淀; 细胞沉淀用 PBS 重悬再离心去上清, 重复清洗细胞 3 次, 去除上清后  $-80^{\circ}\text{C}$  保存或继续进行实验。

注: 尽量将上清液彻底吸干再保存。

#### C 贴壁细胞交联:

细胞量: 约  $1-2 \times 10^7$  个

贴壁细胞培养好后, 用胰酶消化或者细胞刮刮下转移到离心管中, 3000rpm 离心收集细胞沉淀; 细胞沉淀用 PBS 重悬再离心去上清, 重复清洗细胞 3 次, 去除上清后  $-80^{\circ}\text{C}$  保存或继续进行实验。

注: 尽量将上清液彻底吸干再保存。

### 探针制备

体外转录或直接合成方法制备生物素标记的靶 RNA 和阴性对照探针, 一般使用目的 RNA 的反义链作为对照组探针。

(赛诚生物提供探针制备服务, 如有需要欢迎咨询)

### 需要的额外材料:

生物素标记的 RNA 探针

旋转仪

磁力架 (赛诚有售, 如有需要欢迎咨询)

银染试剂

Western blotting 试剂

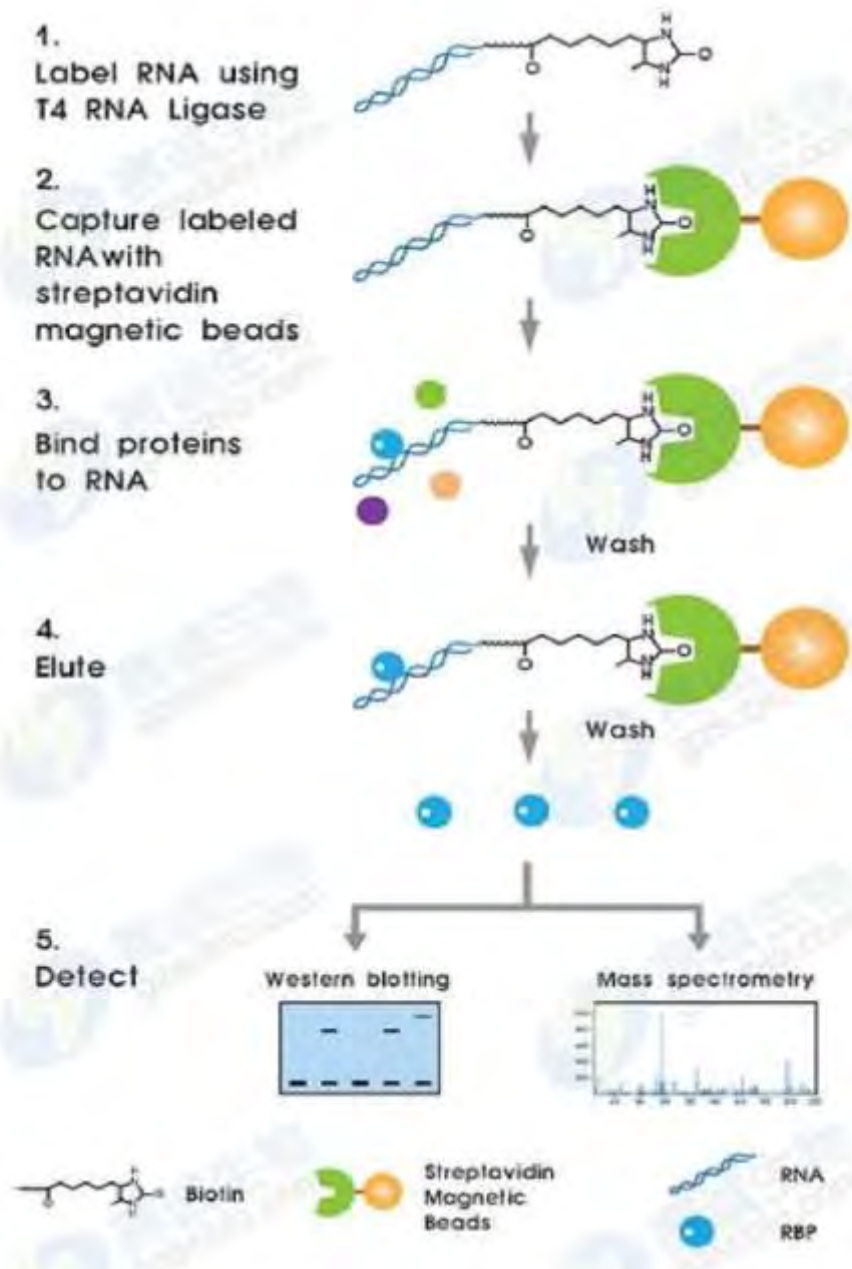
Nitrocellulose 或 PVDF 膜

化学发光底物

电泳仪等

### 实验过程摘要:

如图 1 所示, RNA pull-down 使用体外转录法标记生物素 RNA 探针, 首先将 RNA 探针与链亲和素标记的磁珠结合形成 RNA-磁珠复合物, 然后与胞浆蛋白提取液孵育, 经适当条件洗涤使 RBP 与孵育液中的其他成分分离。可以使用非变性生物素洗脱缓冲液或 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱样品。复合物洗脱后, 通过 Western Blot 实验检测特定的 RNA 结合蛋白是否与 RNA 相互作用, 或通过 MS 质谱分析互作蛋白。



## RNA pull-down 实验步骤

在整个实验中，应采取所有标准预防措施以尽量避免 RNase 污染。

### A、裂解细胞

细胞量：约  $1-2 \times 10^7$  个

1. 向细胞沉淀中加入 1mL Cell lysis buffer (SCRPD-1)，使用前每 mL 裂解液加入 10uL 蛋白酶抑制剂 (SCRPD-5) 和 12uL PMSF (SCRPD-6)，吹打均匀后于 4°C 冰箱翻转裂解 1-2h。

注：1mL 的细胞裂解液足够一次实验的 input，目的组（或阳性对照组），阴性对照组，即两个反应的量。

2. 4°C，12000rpm 离心 15min。将上清转移到一个新的 1.5mL 的 EP 管中，标识清楚。裂解液继续 IP 实验或者储存在 -80°C。

### B、磁珠先与探针孵育

1. 标记实验所需的无 RNA 酶 1.5ml EP 管，包括 input 组、阳性探针组、阴性对照组（或者 input、目的探针+、目的探针-阴性对照）

2. 上下轻微颠倒重悬磁珠 (SCRPD-4) 吸取 50uL 重悬后的磁珠悬液于每个无 RNA 酶 1.5mL EP 管中，短暂离心后置于磁力架上，待液体澄清后去上清；

注：input 组不加探针和磁珠，磁珠不要冷冻，不用干裂。

3. 每管加入 500uL Binding Buffer (SCRPD-2)，涡旋振荡 10S 清洗磁珠，短暂离心后置于磁力架上，待液体澄清后去上清，重复清洗磁珠 2 次，去上清；

4. 用 500uL 的 Binding Buffer (SCRPD-2) 重悬磁珠，加入适量探针于相应 EP 管中，封口膜封口后，置于 4°C 冰箱翻转孵育 6-8 小时。

注：探针用量根据 RNA 片段长度决定，阳性对照探针用量建议 300ng 左右；其他 RNA 建议参考用量为 RNA 长度在 500nt 以内，探针用量 300ng-500ng 每反应；RNA 长度在 1000nt 以内，探针用量为 500ng-1ug；以此类推。

### C、磁珠-探针与裂解液孵育

1. 将 4°C 冰箱的磁珠-探针混合物短暂离心后置于磁力架上，待液体澄清后去上清，用 500uL Binding Buffer (SCRPD-2) 清洗磁珠 1 次，去除上清后依次加入表 1 试剂

表 1 RNA-蛋白质结合反应的主混合物的反应组分

试剂	用量
Binding buffer (SCRPD-2)	1 mL
RNase Inhibitor (SCRPD-7)	5uL
细胞裂解物	100-300uL

2. 上下颠倒轻微混匀，封口，置于 4℃ 冰箱翻转孵育过夜，剩余裂解液取 10-30uL (10%) 作为 **input 组** 于另一 EP 管中；

3. 过夜孵育的混合物短暂离心后置于磁力架上，待液体澄清后去上清，加入 1mL wash buffer (SCRPD-3)，涡旋振荡 10S 清洗磁珠，短暂离心后置于磁力架上，去上清，重复清洗磁珠 5 次（共 6 次），去上清，磁珠产物进行下一步；

#### D、蛋白产物洗脱

1. 于每组磁珠中分别加入 40uL wash buffer (SCRPD-3) 和 10uL 5xLoading buffer (SCRPD-8) 于 100℃ 煮 10min，短暂离心后置于磁力架上，取上清至新的 EP 管中，即为 RNA pull-down 产物。

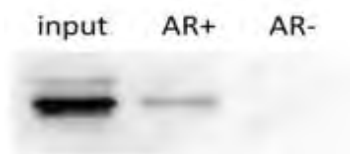
2. input 组直接加入适量 5xLoading buffer (SCRPD-8) 于 100℃ 煮 10min。

3. 获得的产物可直接用于银染检测或质谱检测或 WB 检测。一般各取 10uL 进行上样跑胶银染。

### 结果示例：

#### 阳性体系 WB 检测：

WB 检测 AR RNA 与 HUR 蛋白是否结合，用标记的 AR RNA 的近端 3' UTR 含有 HuR 和聚 (C) 结合蛋白 (CP1 和 CP2) 的富含 UC 的区域的阳性对照组探针 AR+ 与细胞裂解物富集 HuR RBP；用不含有 HuR 或 poly (C) BP 结合位点的阴性对照探针 AR- 孵育不会富集 HuR RBP。

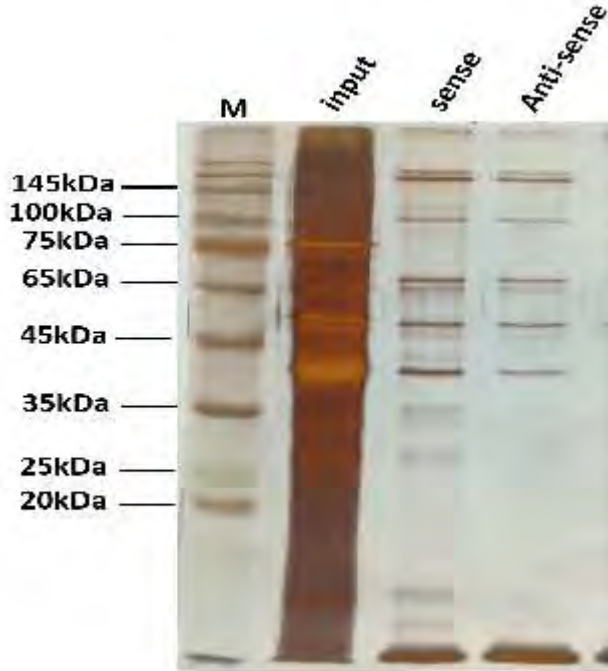


抗体：HUR

AR+特异性富集蛋白 HUR

## RPD 结果示例：蛋白产物银染结果

通过 RNA pull-down 实验捕获与 RNA-A 结合的蛋白质。



银染可以看到明显的蛋白条带，并且目的 RNA 正义链探针组相对于其反义链阴性对照探针组有差异条带，后续可以进行质谱分析 RNA 结合的蛋白，或者进行 WB 检测靶蛋白的结合。

**问题解决方案:**

问题	原因	解决方法
RNA 降解	工作环境有 RNase 污染	清洁工作区域，确保所有用具和试剂都不含核酸酶
	RNA 在体外转录过程中降解	转录后，通过凝胶电泳检测确保 RNA 完整性
RNA 结合蛋白的回收效率低	结合反应未优化	优化孵育时间，温度，盐和洗涤剂以进行结合反应；滴定标记的 RNA 到蛋白质裂解物的量；使用更浓缩的裂解液
	用于捕获的磁珠量不足	增加用于捕获的磁珠量
	用于捕获的 RNA 量不足	增加反应中标记的 RNA 的量
无法回收 RNA 结合蛋白	样品中靶蛋白的量不足	增加样品量
	样品与结合反应不相容	使用脱盐柱缓冲液交换样品
	结合反应未优化	优化孵育时间，温度，盐和洗涤剂以进行结合反应；滴定标记的 RNA 到蛋白质裂解物的量；使用更浓缩的裂解液
	RNA 结合蛋白对标记的 RNA 具有低亲和力	在蛋白质结合 RNA 后加入交联剂（例如 UV 等）
RNA 结合蛋白的高非特异性结合	结合反应未优化	优化孵育时间，温度，盐和洗涤剂以进行结合反应
	洗涤严格性不足	提高洗涤缓冲液的严格性；加入盐和/或洗涤剂
	标记的 RNA 与裂解物的比率未被优化	用蛋白质裂解物滴定标记的 RNA；将裂解液浓度降至 ~2mg / mL
WB 信号低	信号不足	增加二抗的量；使用更灵敏的化学发光检测（例如，SuperSignal Dura 或 SuperSignal Femto 化学发光底物）
	抗体质量差	具有细胞裂解物的预筛选抗体；包括细胞裂解物作为 WB 的对照
	裂解物中的蛋白质不足	增加样品量；确定蛋白质的替代来源；使用更浓缩的裂解液