

RNA Pulldown Kit

RNA Pulldown 试剂盒

目录号

DLI201

产品简介

RNA pulldown 技术利用生物素标记的 RNA 作为诱饵分子，富集 RNA 结合蛋白（RBP）的实验技术。RNA pulldown 技术是使生物素标记的 RNA 探针与细胞全蛋白提取液孵育，形成 RNA-蛋白质复合物。该复合物可被链霉亲和素标记的磁珠结合并分离纯化。洗脱获取到的复合物，可以用于 western blot 实验或蛋白质质谱实验。

产品组成

组分	20 T	储存
RNA structure buffer	1 mL	4 °C
Streptavidin beads	200 µL	4 °C
SA binding buffer	10 mL	4 °C
Biotin pulldown buffer	36 mL	4 °C
Protease inhibitor	300 µL	-20 °C
RNase inhibitor	2 mL	-20 °C
Binding enhancer PD	8 mL	4 °C
Biotin washing buffer	30 mL	4 °C
WB elution buffer	2 mL	4 °C

MS elution buffer

2 mL

4 °C

产品应用

- ◆ RNA（包括 mRNA、非编码 RNA）结合蛋白质研究；
- ◆ RNA 功能结构域研究；RBPs 功能结构域研究。

产品特点

- ◆ 操作时长短：实验全程 3 小时内完成；
- ◆ 非特异性低：特有的封闭及洗涤组合，大幅度降低阴性对照组结合蛋白，pulldown 组蛋白质选择更简便更准确；
- ◆ 蛋白质活性高：特有的结合缓冲液有效保护 RNA 结合蛋白的活性，大幅度提高结合率；
- ◆ 适配下游实验类型广泛：试剂盒含有适配 WB 及 MS 检测两种洗脱液。

使用方法

- 1. RNA 结构形成（时间 30 min）**
 - a. 根据生物素标记 RNA 探针的长度，按照每 1000 nt 取 1 µg 探针，取相应质量的 RNA 探针；
 - b. 探针加 RNA structure buffer 定容至 50 µL，置于 90 °C 水浴变性 2 min 后，快速转移于冰浴条件静置 2 min；
 - c. 转移离心管至室温静置 20 min，形成 RNA 二级结构。
- 2. 探针-磁珠结合（时间 40 min）**
 - a. 取 10 µL Streptavidin beads 置于 2 mL 无 RNase 离心管中，加入 100 µL SA binding buffer 颠倒混匀后，置于磁力架上去除上清；
 - b. 磁珠中加入 200 µL SA binding buffer 及目标 RNA 探针（或阴性对照探针作为 NC 组）室温摇动孵育结合 30 min 后，去除上清并继续加入 20 µL SA binding buffer 悬浮保存待用（标示为 pulldown）；



3. 蛋白提取 (时间 30 min)

- 新鲜细胞**: 收集 1×10^7 细胞加入 $1 \times \text{PBS}$ 洗涤两次, 最后一次吸干残余 PBS; **冻存细胞**: 1000 rpm 离心 5 min 后, 去除干净 PBS; **组织样品**: 取 0.1~0.2 g 组织, 使用液氮在研钵中研磨成单细胞状态;
- 细胞沉淀依次加入 1 mL Biotin pulldown buffer、15 μL Protease inhibitor 及 100 μL RNase inhibitor 后, 使用 2~3 mm 探头, 600~800 W 功率, 冰浴条件下 5 s ON、5 s OFF 超声 15~30 min;
- 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件 12000 g 离心 10 min, 磁力架上转移 200 μL 上清至新离心管中 (标示为 Input, -20°C 暂存);

4. RNA pulldown (时间 1.5 h)

- 转移 800 μL 上清至 pulldown 离心管 (在第 2 部分制备完成, 含 20 μL 磁珠-探针悬液), 并继续加入 400 μL Binding enhancer PD 及 800 μL Biotin pulldown buffer;
- 室温摇动孵育结合 1 h, 磁力架上收集磁珠去除上清液, 磁珠中, 加入 500 μL Biotin washing buffer, 垂直混匀器上室温洗涤 5 min, 磁力架上静置 1 min 收集磁珠并去除上清, 重复本步 2 次 (共洗涤 3 次)。

5. 洗脱 (时间 10 min)

- 选择 1: Western blot 或蛋白染色: pulldown 样品加入 100 μL WB elution buffer, 轻弹混匀后 65 $^{\circ}\text{C}$ 洗脱 10 min 后, 在磁力架上转移上清至新离心管中 (即为 pulldown 洗脱蛋白溶液);
- 选择 2: 质谱检测: pulldown 样品加入 100 μL MS elution buffer, 95 $^{\circ}\text{C}$ 摇动孵育洗脱 10 min, 在磁力架上转移上清至新离心管中 (即为 pulldown 洗脱蛋白溶液)。

注意事项

- ◆ 实验全程需要使用无 RNase 离心管、无 RNase 枪头;
- ◆ 孵育期间, 间隔 5 min 轻弹混匀;
- ◆ 磁力架上收集磁珠时间控制在 1 min 内完成;

- ◆ 可根据需要设置阴性对照组, 阴性对照组探针为 lacZ 或互补链探针;
- ◆ 超声破碎细胞时, 如果产生气泡可以缩短为 3 s ON、3 s OFF;
- ◆ 超声破碎细胞效果不佳时, 已造成非特异性富集;
- ◆ 磁力架上收集磁珠时间控制在 1min 内完成;
- ◆ 每次洗涤尽量去除干净洗涤液;
- ◆ MS elution buffer 不含去污剂可以用于下游质谱分析;
- ◆ 洗脱液中加入蛋白质上样缓冲液经 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性后可以开展银染或 Western blot 检测。

保存条件

各组分保存条件见产品组成, 保质期 12 个月。4~8 $^{\circ}\text{C}$ 运输。

技术支持

本公司产品使用过程中如有任何疑问与建议, 欢迎随时与我们联系:
product@tsingke.com.cn。

说明书版本号

1.1.1.1102.2508

