天净沙系列

CAT#:241211

低温运输，-20℃保存

天净沙

蛋白质-RNA Pull-Down 试剂盒（生物素-SA 磁珠法）

Protein-RNA Pull-Down Kit (Biotin-SA Magnetic Bead Method)

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是基于生物素-SA 磁珠法开发的蛋白质-RNA Pull-Down 试剂盒。它具有以下特点：

1. 即开即用，操作便捷。
2. 本产品提供试剂足够进行 30 次蛋白质-RNA Pull-Down 实验。
3. 磁珠经过优化能更高效的结合 RNA 及其结合蛋白。
4. 兼容性强，收集的产物可以进行后续多种实验。
5. 收集到的 RNA 保持原有的生物活性。
6. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用大扁盒包装

成分	编号	规格	包装
PR Pull-Down 专用裂解液	241211a	20 mL	20 mL 本色瓶
PR Pull-Down 专用磁珠	241211b	1.5 mL	1.5 mL 绿盖管
NT2 缓冲液	6-2245	45 mL	50 mL 本色瓶
PR Pull-Down 专用 RNA 折叠缓冲液	241211c	2 mL	5 mL 本色瓶
PR Pull-Down 专用洗涤液	241211d	100 mL	100 mL 本色瓶
PR Pull-Down 专用蛋白酶抑制剂	241211e	600 μL	1.5 mL 本色管
PR Pull-Down 专用 RNase 抑制剂	241211f	200 μL	0.5 mL 红盖管
PR Pull-Down 专用洗脱液	241211g	2 mL	5 mL 本色瓶
使用手册	241211sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备物品

PBS、RNase-free 水、生物素标记的 RNA 探针、生物素 RNA 标记混合物、磁力架、混匀仪、低温离心机、超声波破碎仪、离心管。

使用方法

一：探针的制备

1. 根据目标 RNA 序列设计带有 T7 启动子（TAATACGACTCACTATAGGG）的引物，以目标序列的 DNA 质粒为模板，PCR 分别获得 T7-正义 RNA（实验组）和 T7-反义 RNA（对照组）转录模板，按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明书要求回收纯化目标 DNA。

引物名称	引物序列
正义链-正引物 (带 T7 启动子)	5′-TAATACGACTCACTATAGGG+目标 RNA 头部序列-3′

正义链-反引物	5′-目标 RNA 尾部序列的反向互作序列-3′
反义链-正引物	5′-目标 RNA 头部序列-3′
反义链-反引物 (带 T7 启动子)	5′-TAATACGACTCACTATAGGG+目标 RNA 尾部序列的反向互作序列-3′

2. 以上述 DNA 为模板，按照自备的 RNA 体外转录试剂盒说明书配置反应体系。
3. 为了避免转录产物中的游离生物素 UTP 竞争结合磁珠，此处最好采用 RNA 纯化试剂盒来处理转录产物，但此操作可能造成一定的产物损失，可以根据具体情况决定是否进行此步操作。
4. 取 2 μL RNA 检测浓度，取 1~2 μL RNA 进行 2%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量和长度；符合要求的 RNA 置于- 80℃保存或直接用于后续实验。

注：由于 RNA 容易降解，最好在实验当天或前一天进行体外转录实验。

二：动物细胞样本裂解

5. 实验组和对照组一共取 2E7~4E7 个细胞，用预冷的 PBS（RNase-free）清洗细胞 2~3 次，每次 4℃ 500×g 离心 5 min 收集沉淀，去除培养基成分。
6. 将样本置于冰上，加入 0.6 mL 预冷的 PR Pull-Down 专用裂解液、6 μL PR Pull-Down 专用蛋白酶抑制剂和 3 μL PR Pull-Down 专用 RNase 抑制剂，吹打混匀。
7. 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，也可以置于冰上裂解 30 min，间隔手动混匀。
8. 4℃ 12000×g 离心 15 min，收集上清至新的无 RNase 离心管中。
9. 取 30 μL 作为 input，剩余上清平分为两份用于 RNA pull-down 实验，置于冰上备用或-80℃保存。

三：动物组织样本裂解

10. 采用预冷的 PBS (RNase-free) 清洗新鲜组织 2~3 次，彻底去除血液等成分；如果样本为冷冻组织，在取样时也需要进行清洗操作。
11. 实验组和对照组共取 0.2~0.4 g 干净组织，用液氮在研钵中充分研磨，转移粉末至预冷的、新的无 RNase 离心管中。
12. 同 7-9 步。注：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。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。

四：磁珠准备

	13. 将 PR Pull-Down 专用磁珠上下颠倒混匀，取实验组和对照组一共所需的 80 μL 磁珠到新的无 RNase 离心管中。 14. 加入 1 mL NT2 缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。 15. 重复上步操作一次。 16. 加入 400 μL NT2 缓冲液，上下颠倒重悬磁珠，然后将磁珠平分为两组，每组各约 200 μL，转移到新的无 RNase 离心管中，记为实验组和对照组。 **五：漂洗液准备** 17. 为了防止实验过程中的蛋白和 RNA 降解，需要向漂洗液中添加蛋白酶抑制剂和 RNase 抑制剂。在 10 mL 离心管中加入实验组和对照组总共所需的 5 mL PR Pull-Down 专用洗涤液、25 μL PR Pull-Down 专用蛋白酶抑制剂和 2.5 μL PR Pull-Down 专用 RNase 抑制剂，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。 **六：RNA pull-down** 18. 取实验组和对照组 RNA 探针各 3 μg，95℃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 PR Pull-Down 专用 RNA 折叠缓冲液，室温放置 30 min。 19. 将 RNA 探针分别加入对应步骤四制备的磁珠中，混匀仪上室温孵育 30 min。 20. 放磁力架上静置 1 min 并弃上清。 21. 每组加入 500 μL 步骤五准备的漂洗液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。 22. 重复上步操作一次。 23. 加入相应组别的样本裂解液，混匀仪上 4℃孵育 2~4 h。 24. 放磁力架上静置 1 min 并弃上清。 25. 每组加入 500 μL 漂洗液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 弃上清。 26. 重复上步漂洗操作两次，共漂洗三次，保留磁珠。 **七：蛋白洗脱** 27. 向磁珠中加入 50 μL PR Pull-Down 专用洗脱液，涡旋震荡 20 s，混匀仪上室温洗脱 10~15 min；涡旋震荡 20 s，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，-80℃保存。该洗脱产物适用于后期各种检测，例如质谱、SDS-PAGE 或 Western-blot 等。
关联产品	蛋白质-DNA Pull-Down 试剂盒（生物素-SA 磁珠法）