

RNA pull-down 阳性试剂盒说明书

产品货号: KT103-02

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。本试剂盒包含 12 个 pull-down 反应的试剂。

试剂盒包装组分:

表 1 试剂盒包装组分信息

4℃保存试剂		
试剂	编号	数量
Cell lysis buffer	SCRPD-1	10mL
Binding buffer	SCRPD-2	65mL
Wash buffer	SCRPD-3	150 mL
链霉亲和素磁珠	SCRPD-4	650uL
-20℃保存试剂		
蛋白酶抑制剂	SCRPD-5	100uL
RNase Inhibitor	SCRPD-6	65uL
5x SDS Loading buffer	SCRPD-7	150uL
阳性对照体系: (-20℃保存)		
阳性对照探针 AR+	SCRPD-8	10ug
阴性对照探针 AR-	SCRPD-9	10ug
HUR 抗体 (兔抗, abcam, ab200342)	SCRPD-10	10uL, 足够检测 4-5 个 Western blots

需要的额外材料:

生物素标记的 RNA 探针
旋转仪
可替代的洗脱液: SDS PAGE 上样缓冲液
银染试剂
TBS-T
Western blotting 试剂
Nitrocellulose 或 PVDF 膜
抗兔二抗
化学发光底物
电泳仪等

阳性对照体系说明:

阳性对照组探针 AR+是 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(AR 3'UTR 序列正义链探针)。这些 RNA 结合蛋白调节 mRNA 稳定性(HuR)

和 mRNA 转录和翻译 (CP1 和 CP2)。 阴性对照探针 AR-为阳性探针的反义序列, 不含有 HuR 或 poly (C) BP 结合位点。

阳性为与 HUR 结合的, 序列包含

5'-CUGGGCUUUUUUUUCUCUUUCUCUCCUUUCUUUUUCUUCUCCUCUCCUA-3'
CTGGGCTTTTTTTTCTCTTTCTCTCCTTTCTTTTTCTTCTTCCCTCCCTA

注意事项:

- 1 在操作过程中以及使用用于标记的 RNA 时, 保持无核酸酶的环境。戴手套, 仅使用与核酸操作兼容的试剂和塑料。
- 2 不要冷冻或干燥链霉抗生物素蛋白磁珠。 冷冻或干燥将导致珠子聚集并失去结合活性。
- 3 为了使蛋白质降解最小化, 在细胞裂解物制备物中包括蛋白酶抑制剂
- 4 在 SDS-PAGE Loading buffer 缓冲液对于一次性应用是可接受的。 沸腾会导致珠粒聚集和结合活性丧失。

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。

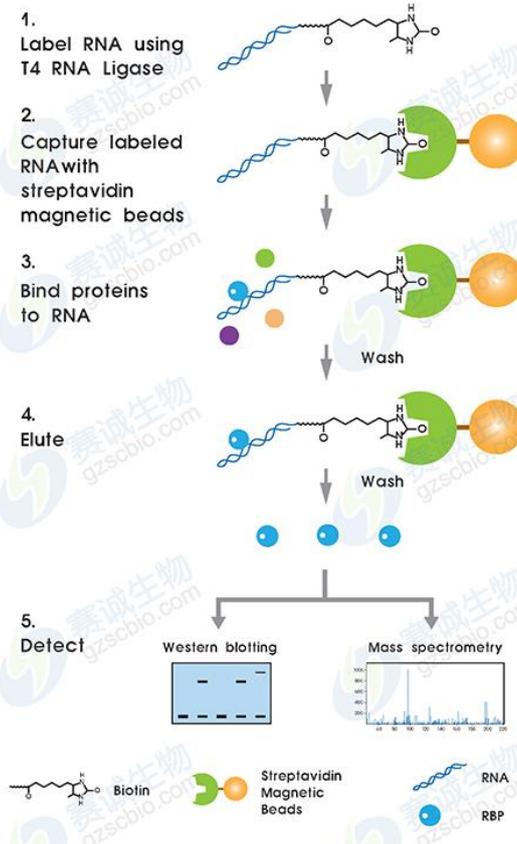


图 1 RNA pull-down 试剂盒实验过程示意图

实验步骤

A、裂解细胞

细胞量：约 2×10^7 个

- 1 用细胞刮将细胞刮下来，收集至无 RNA 酶 EP 管。
- 2 1500rpm, 4°C 离心 5min, 弃上清, 收集细胞, 用 PBS 溶液清洗细胞 1-2 次
- 5 加入 1mL Cell lysis buffer, 使用前每 mL 裂解液加入 10uL 蛋白酶抑制剂, 吹打均匀后于 4°C 冰箱翻转裂解 1-2h。
- 6 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、磁珠与探针孵育

- 1 上下轻微颠倒重悬磁珠;
- 2 标记实验所需的无 RNA 酶 1.5ml EP 管, 包括阳性对照探针正反义链组, 目的探针正反义链组, 空磁珠组 (分组: AR+, AR-, beads)
- 3 吸取 50uL 重悬后的磁珠悬液于每个无 RNA 酶 1.5mL EP 管中, 去上清;
- 4 每管加入 500uL Binding Buffer, 轻微上下颠倒混匀清洗磁珠,;
- 5 3000rpm 离心 1 min, 去上清, 重复清洗磁珠 2 次, 去上清;
- 6 用 500uL 的 Binding Buffer 重悬磁珠, 加入 1-2ug 探针于相应 EP 管中, beads 组不加探针;
- 7 封口膜封口后, 置于 4°C 冰箱翻转孵育 6-8 小时。

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 3000rpm 离心 2min, 去上清, 用 500uL Binding Buffer 清洗磁珠 1 次, 然后依次加入表 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	1 mL
RNase Inhibitor	5uL
细胞裂解物	100-300uL

- 2 加入 100-300uL 细胞裂解液 (beads 组不加探针), 上下颠倒轻微混匀, 封口, 置于 4°C 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 3000rpm 离心 2min, 去上清, 加入 1mL wash buffer, 上下颠倒轻微混匀, 清洗磁珠, 3000rpm 离心 1min, 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 (包括 input 组和 beads 组) 中分别加入 40uL wash buffer 和 10uL 5xLoading buffer 于 100°C 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 获得的产物可直接用于银染检测或质谱检测或 WB 检测。

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 (图 2)。



图 2 AR+特异性富集蛋白 HUR

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