

# GenSeq® RNA Pull down试剂盒

**GS-EG-010**

Instruction Manual Version 1.0

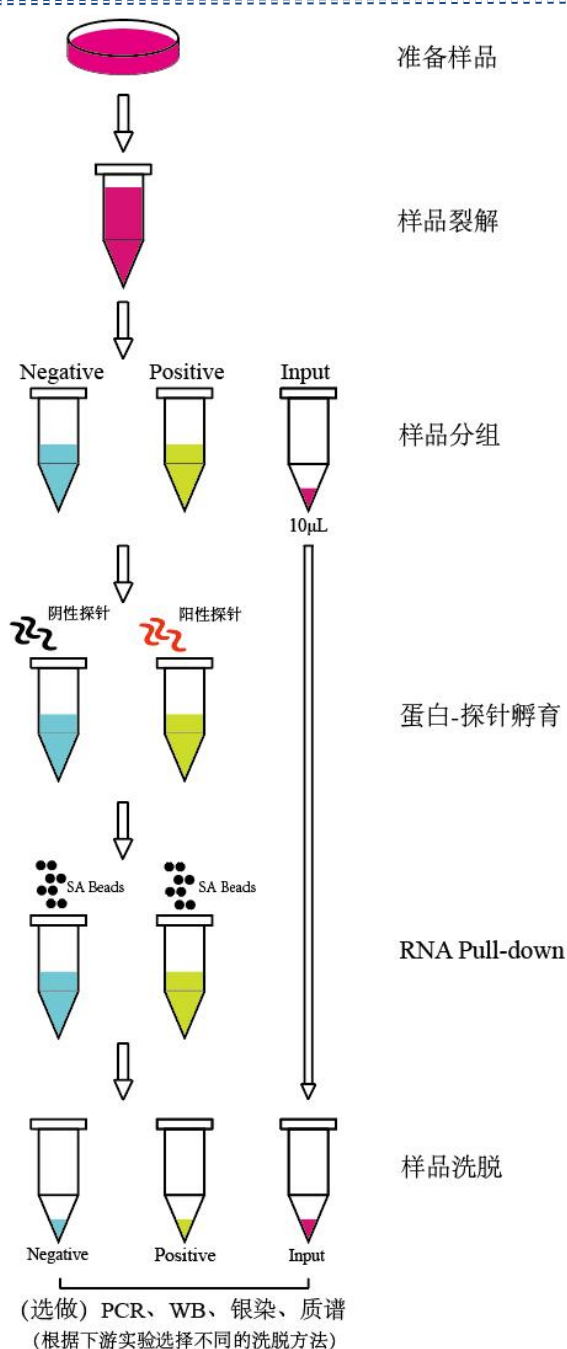
(Updated, Dec 2024)

## 产品简介

RNA pull down 是一种研究 RNA - 蛋白质相互作用的实验技术,是基因表达调控研究的有力工具。利用生物素标记的 RNA 探针,将与之作用的 RNA 或蛋白质“拉下来”,分离纯化后,就可以得到与目标 RNA 区域作用的 RNA 或蛋白质。

GenSeq® RNA pull down 试剂盒专为 RNA pull down 实验设计,包含了 RNA pull down 流程中的所有核心试剂,具有更好的性价比。优化过的实验流程不仅可以富集检测低丰度目的蛋白-RNA 复合物,而且信噪比更高。RNA pull down 实验得到的产物可以通过 Western Blot 检测特定的 RNA 结合蛋白是否与 RNA 相互作用;质谱实验检测特定的 RNA 结合蛋白鉴定蛋白质类型;通过荧光定量 PCR 或高通量测序鉴定目标 RNA 是否与其他 RNA 相互作用。

## 实验流程图



| 试剂盒组分 (12 次反应*)           | 体积     | 保存条件  |
|---------------------------|--------|-------|
| RP Lysis Buffer           | 4 mL   | 4°C   |
| RNA Structure Buffer      | 800 µL | 4°C   |
| 10×Binding Buffer         | 6 mL   | 4°C   |
| SA Beads                  | 630 µL | 4°C   |
| 2×SDS-PAGE Loading Buffer | 400 µL | 4°C   |
| Protease Inhibitor        | 50 µL  | -20°C |
| RNase Inhibitor           | 70 µL  | -20°C |

\*:此规格试剂盒可用于 6 次阳性探针 RNA Pulldown 反应+ 6 次阴性探针 RNA Pulldown 反应。

| 试剂盒组分（24 次反应*）            | 体积      | 保存条件  |
|---------------------------|---------|-------|
| RP Lysis Buffer           | 8 mL    | 4°C   |
| RNA Structure Buffer      | 1.6 mL  | 4°C   |
| 10×Binding Buffer         | 12 mL   | 4°C   |
| SA Beads                  | 1250 µL | 4°C   |
| 2×SDS-PAGE Loading Buffer | 800 µL  | 4°C   |
| Protease Inhibitor        | 100 µL  | -20°C |
| RNase Inhibitor           | 140 µL  | -20°C |

\*:此规格试剂盒可用于 12 次阳性探针 RNA Pulldown 反应+ 12 次阴性探针 RNA Pulldown 反应。

## 自备材料

=====

- ✓ 磁力架（适配1.5 mL EP 管）
- ✓ 移液器及吸头（无核酸酶）
- ✓ 无核酸酶管（1.5 mL EP 管）
- ✓ 4℃ 离心机
- ✓ 涡旋混匀仪
- ✓ 杜氏匀浆器
- ✓ PCR仪
- ✓ 生物素标记 RNA 探针（阳性/阴性）
- ✓ 无核酸酶水
- ✓ PBS 缓冲液

## 实验步骤

### 1. 样品预处理

#### ✧配置 Complete Lysis Buffer

根据反应数，按下表配置合适体积的 Complete Lysis Buffer\*，混匀后冰上放置备用。

|                    | × 1         | × N             |
|--------------------|-------------|-----------------|
| RP Lysis Buffer    | 500 $\mu$ L | 500 $\mu$ L × N |
| Protease Inhibitor | 2.5 $\mu$ L | 2.5 $\mu$ L × N |

\*：一般而言，每个样品约需 500  $\mu$ L Complete Lysis Buffer。

#### ✧悬浮细胞：

- 1) 取约 $1 \times 10^7$ 细胞在 4°C 1000×g 离心 5 min，收集细胞沉淀，吸弃上清；
- 2) 用 1 mL 冰上预冷的 1×PBS 重悬细胞沉淀，4°C，1000×g 离心 5 min，小心吸弃上清；
- 3) 重复步骤（2）一次；
- 4) 根据反应数，用合适体积的 Complete Lysis Buffer 重悬细胞，轻轻吹散细胞，放置在冰上裂解 10 min；
- 5) 14,000×g，4°C 离心 10 min，吸取上清，即为蛋白裂解产物；
- 6) 可取 10  $\mu$ L 蛋白裂解产物作为 input 组放入 -80°C 保存备用，剩下蛋白裂解产物一分为二进行后续实验，一份用于阳性探针 RNA Pulldown 反应，一份用于阴性探针 RNA Pulldown 反应。

#### ✧单层细胞或贴壁细胞

- 1) 用 10 mL 冰上预冷的 1×PBS 清洗培养皿或培养瓶中的细胞两次；
- 2) 加入 10 mL 预冷 PBS 后用细胞刮将细胞刮下来，收集至 EP 管中；
- 3) 4°C，1000×g 离心 5 min，小心吸弃上清，收集细胞沉淀；
- 4) 根据反应数，用合适体积的 Complete Lysis Buffer 重悬细胞，轻轻吹散细胞，放置在冰上裂解 10 min；
- 5) 14,000×g，4°C 离心 10 min，吸取上清，即为蛋白裂解产物；
- 6) 可取 10  $\mu$ L 蛋白裂解产物作为 input 组放入 -80°C 保存备用，剩下蛋白裂解产物一分为二进行后续实验，一份用于阳性探针 RNA Pulldown 反应，一份用于阴性探针 RNA Pulldown 反应。

#### ✧组织样品

- 1) 取 100 mg 新鲜组织，在冰上预冷的 1×PBS 中洗涤组织以去除血液等杂质；
- 2) 将清洗后的组织转移至适量预冷的 1×PBS 中，用杜氏匀浆器或其他细胞分离设备使组织分散为单个细胞。（注意：步骤（1-2）操作须迅速，尽量 5 min 内完成，避免时间太久导致 RNA 降解）；

- 3) 4℃, 1000×g 离心 5 min, 弃上清, 收集细胞沉淀;
- 4) 根据反应数, 用合适体积的Complete Lysis Buffer重悬细胞, 轻轻吹散细胞, 放置在冰上裂解10 min;
- 5) 14,000×g, 4℃ 离心10 min, 吸取上清, 即为蛋白裂解产物;
- 6) 可取10 μL蛋白裂解产物作为 input 组放入-80℃保存备用, 剩下蛋白裂解产物一分为二进行后续实验, 一份用于阳性探针 RNA Pulldown 反应, 一份用于阴性探针 RNA Pulldown 反应。

## 2. 蛋白-探针孵育

- 7) 取 3 μL 100 μM 的生物素标记的 RNA 探针\*, 加入 47 μL RNA Structure Buffer, 95℃ 加热2 min, 立刻放置在冰上, 静置3 min, 再放在室温静置30 min;  
\*: 阳性探针为一个反应, 阴性探针为一个反应, 阳性探针和阴性探针不可混为一管进行反应。
- 8) 按下表配置蛋白-探针孵育缓冲液:

| 试剂                 | 体积 (μL) |
|--------------------|---------|
| RNase Inhibitor    | 5       |
| Protease Inhibitor | 2.5     |
| 10×Binding Buffer  | 50      |
| RNA 探针 (步骤7)       | 50      |
| 蛋白裂解产物 (步骤6)       | 192.5   |
| 无核酸酶水              | 200     |
| 总体积                | 500     |

- 9) 移液枪轻柔吹打混匀, 室温旋转混匀 1h。

## 3. 磁珠准备

- 10) 按反应数准备新的 1.5 mL EP 管, EP 管上做好标记;
- 11) 短暂振荡混匀 SA Beads, 分别取 50 μL 至每个准备好的 EP 管中;
- 12) 将 EP 管放置在磁力架上待溶液澄清 (约2 min);
- 13) 吸弃上清, 勿搅动磁珠, 从磁力架上取下 EP 管;
- 14) 用 1 × Binding Buffer \*洗涤 SA Beads :  
a. 从磁力架取下 EP 管后加入200 μL 1 × Binding Buffer, 用移液枪轻柔吹打混匀;  
b. 将 EP 管放置在磁力架上待溶液澄清 (约2 min);  
c. 吸弃上清, 勿搅动磁珠。

\*: 用无核酸酶水将试剂盒自带的 10 × Binding Buffer 稀释10倍。

- 15) 重复步骤 14)。

## 4. RNA Pull down

- 16) 将步骤9) 中蛋白-探针复合物加入到准备好的磁珠中, 移液枪轻柔吹打混匀;
- 17) 室温旋转孵育2h\*;

\*孵育时间若过度延长, 会增加产物的非特异性, 影响实验结果准确性。

- 18) 短暂离心，将 EP 管置于磁力架上待溶液澄清（约2 min）；
- 19) 吸弃上清，勿搅动磁珠；
- 20) 用 500  $\mu$ L冰上预冷的 1  $\times$  Binding Buffer 洗涤 SA Beads :
  - a. 从磁力架取下 EP 管后加入 500  $\mu$ L 冰上预冷的 1  $\times$  Binding Buffer，用移液枪轻柔吹打混匀；
  - b. 将EP 管放置在磁力架上待溶液澄清（约 2 min）；
  - c. 吸弃上清，勿搅动磁珠。
- 21) 重复步骤 20）五次（即：用 冰上预冷的 1 $\times$ Binding Buffer清洗磁珠共计 6 次）。

## 5. （选做）蛋白洗脱

- 22) 后续实验为质谱：
  - a. 加入 200  $\mu$ L冰上预冷的1 $\times$ PBS 到磁珠中，移液枪轻柔吹打混匀；
  - b. 将 EP 管置于磁力架上待溶液澄清（约2 min）；
  - c. 吸弃上清，勿扰动磁珠；
  - d. -80 $^{\circ}$ C保存磁珠用于后续实验。
- 23) 后续实验为银染或WB：
  - a. 加入30 $\mu$ L 2 $\times$ SDS-PAGE Loading Buffer到磁珠中，移液枪轻柔吹打混匀；
  - b. 95 $^{\circ}$ C 孵育 5-10 min；
  - c. 将 EP 管置于磁力架上待溶液澄清（约2 min）；
  - d. 吸取上清至新的 EP 管中，勿扰动磁珠；
  - e. -80 $^{\circ}$ C保存上清用于后续实验。

## 6. （选做）RNA洗脱（后续实验为PCR或测序）

- 22) 加入500 $\mu$ L的Trizol到磁珠中，涡旋混匀，室温静置5 min，加入100 $\mu$ L的氯仿，涡旋混匀；
- 23) 4 $^{\circ}$ C，12000g离心15min；
- 24) 取上层水相（约 250  $\mu$ L）到新的EP 管中，加入等体积的异丙醇和1 $\mu$ L 糖原，移液枪轻柔吹打混匀，-80 $^{\circ}$ C 沉淀过夜；
- 25) 将沉淀产物 4  $^{\circ}$ C，15,000g 离心 25 分钟；
- 26) 用移液枪吸弃上清，务必注意不要触碰到RNA沉淀；
- 27) 加入1 mL用无核酸酶水配置的 75% 乙醇，4  $^{\circ}$ C，15,000g 离心 15 分钟；
- 28) 用移液枪吸弃上清，务必注意不要触碰到 RNA 沉淀；
- 29) 室温开盖干燥 2-5分钟；
- 30) 加入10  $\mu$ L无核酸酶水充分溶解 RNA 沉淀，取1  $\mu$ L 用于定量，剩余 RNA 立即进行后续实验或-80 $^{\circ}$ C暂存。

---

## FAQ

.....

### 1. 为什么WB检测结果显示条带不符？

Re: WB检测结果显示条带不符的原因主要有以下几种情况：

- 1) 样本投入量过多或过少，导致裂解不充分，或目标蛋白含量太低，提取核蛋白可适当增加细胞或组织的用量，以获得足够实验所需的蛋白量，具体使用量还需要根据实际操作来摸索。
- 2) 探针使用量较低，结合的目标蛋白太少。
- 3) 非特异结合过多，可以调整孵育时间、洗涤次数、探针用量等，提高结合效率。
- 4) 蛋白样本降解，可通过添加蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、样本分装减少冻融次数等方法防止降解。
- 5) RNA 探针降解，需要保持操作环境无核酸酶污染，可通过电泳检测探针完整性。

### 2. 为什么银染后没有目的条带？

Re: 银染实验的灵敏度有限，可能会存在无法显示目的条带的情况，以质谱结果为准。

## 相关产品:

| 试剂盒                                       | 货号        | 规格          |
|-------------------------------------------|-----------|-------------|
| GenSeq® m6A MeRIP Kit                     | GS-ET-001 | 12T、24T、48T |
| GenSeq® m1A MeRIP Kit                     | GS-ET-002 | 12T、24T、48T |
| GenSeq® m5C MeRIP Kit                     | GS-ET-003 | 12T、24T、48T |
| GenSeq® m7G MeRIP Kit                     | GS-ET-004 | 12T、24T、48T |
| GenSeq® ac4C IP Kit                       | GS-ET-005 | 12T、24T、48T |
| GenSeq® RIP Kit                           | GS-ET-006 | 12T、24T、48T |
| GenSeq® O8G IP Kit                        | GS-ET-007 | 12T、24T、48T |
| GenSeq® Ψ IP Kit                          | GS-ET-008 | 12T、24T、48T |
| GenSeq Hi-C Kit                           | GS-EG-003 | 6T          |
| GenSeq® Co-Immunoprecipitation (CoIP) Kit | GS-EG-008 | 12T、24T     |
| GenSeq® CHIRP Kit                         | GS-EG-009 | 12T、24T     |
| GenSeq® RNA Pull Down Kit                 | GS-EG-010 | 12T、24T     |
| GenSeq® RCA DNA Amplification Kit         | GS-MB-002 | 25T、100T    |



上海云序生物科技有限公司

服务电话：021-64878766

网址：<http://www.cloud-seq.com.cn>

地址：上海市松江区漕河泾莘砖公路518号24号楼4楼

