

# PureBinding<sup>®</sup> RNA-Protein pull-down Kit

**Cat.No. P0201 (12 rxns)**

**Cat.No. P0202 (24 rxns)**

Sufficient reagent for RNA pull-down assays per kit

按试剂标签提示分开储存

For research use only, not intended for diagnostic testing.

---

# 目录

背景介绍 .....	1
应用范围 .....	1
实验原理图 .....	1
试剂盒组分 .....	2
对照探针说明 .....	2
实验操作流程图 .....	3
实验时间管理 .....	4
实验前准备 .....	5
实验操作 .....	6
结果展示 .....	9
常见问题及处理方法 .....	9
参考文献 .....	9

---

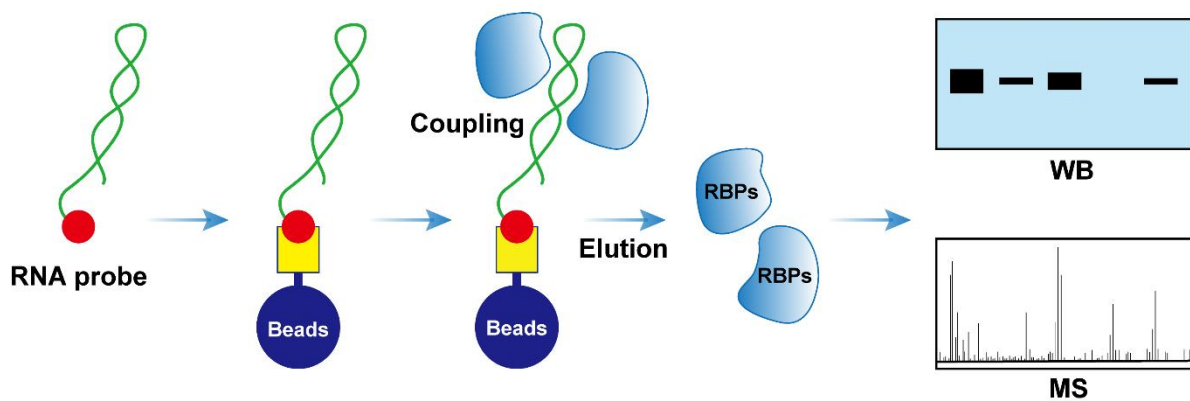
## 背景介绍

RNA pull-down 是检测 RNA 结合蛋白与 RNA 之间相互作用的主要实验手段之一。该技术利用体外转录或合成生物素标记 RNA 模拟天然 RNA 分子，作为探针，与细胞裂解液孵育。探针与裂解液中的蛋白形成 RNA-蛋白质复合物，可被链霉亲和素磁珠特异性结合捕获，从而实现 RNA 结合蛋白 (RBPs) 的捕获富集。可通过对 RNA pull-down 的产物进行 Western Blot 检测，或者结合质谱实验，对 RNA 结合蛋白 (RBPs) 进行检测和筛选。

## 应用范围

- 靶 RNA 结合蛋白的验证或筛选；
- 适用长链、线性 RNA 探针（模拟靶 RNA 序列）直接拉取互作蛋白。

## 实验原理图



## 试剂盒组分

编号	名称	规格 (12 rxns)	规格 (24 rxns)	保存条件
【1】	10× Capture Buffer	3.2 mL	6.4 mL	2~8°C
【2】	10× Wash Buffer	6 mL	12 mL	2~8°C
【3】	RNase 抑制剂	70 μL	140 μL	-20°C
【4】	蛋白酶抑制剂	70 μL	140 μL	-20°C
【5】	Streptavidin Magnetic Beads	300 μL	600 μL	2~8°C
【6】	5× Loading Buffer	1 mL	1.5 mL	2~8°C
【7】	Positive RNA probe	6 μL	12 μL	-20°C
【8】	Negative RNA probe	6 μL	12 μL	-20°C
【9】	HuR Antibody (Rabbit)	6 μL	12 μL	-20°C

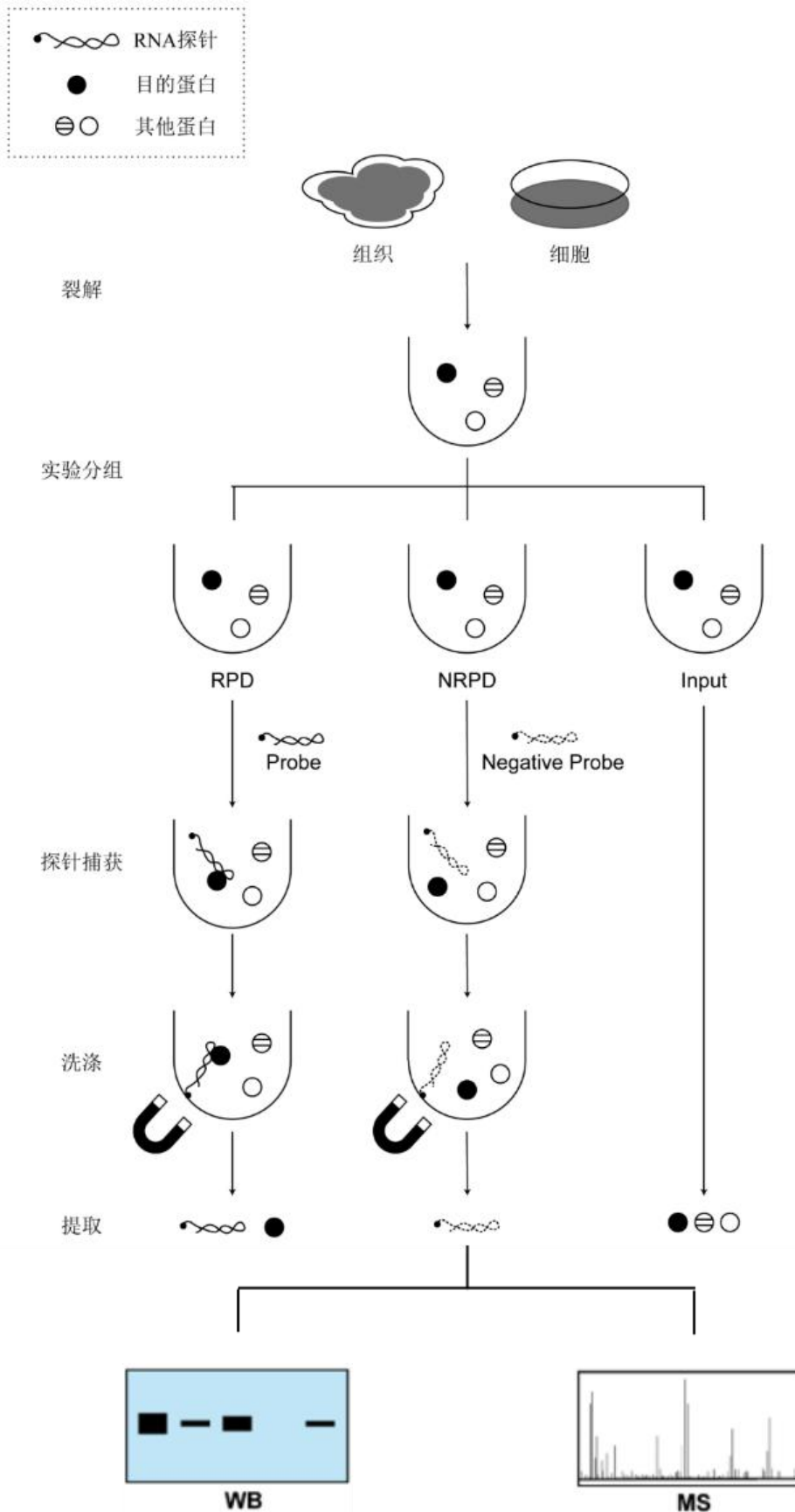
注：对照组与实验组消耗试剂量相同，一次 pull-down 实验（含 Input 组、pull-down 组及一个阴性或阳性对照组），要消耗 2 rxns 次试剂量。

## 对照探针说明

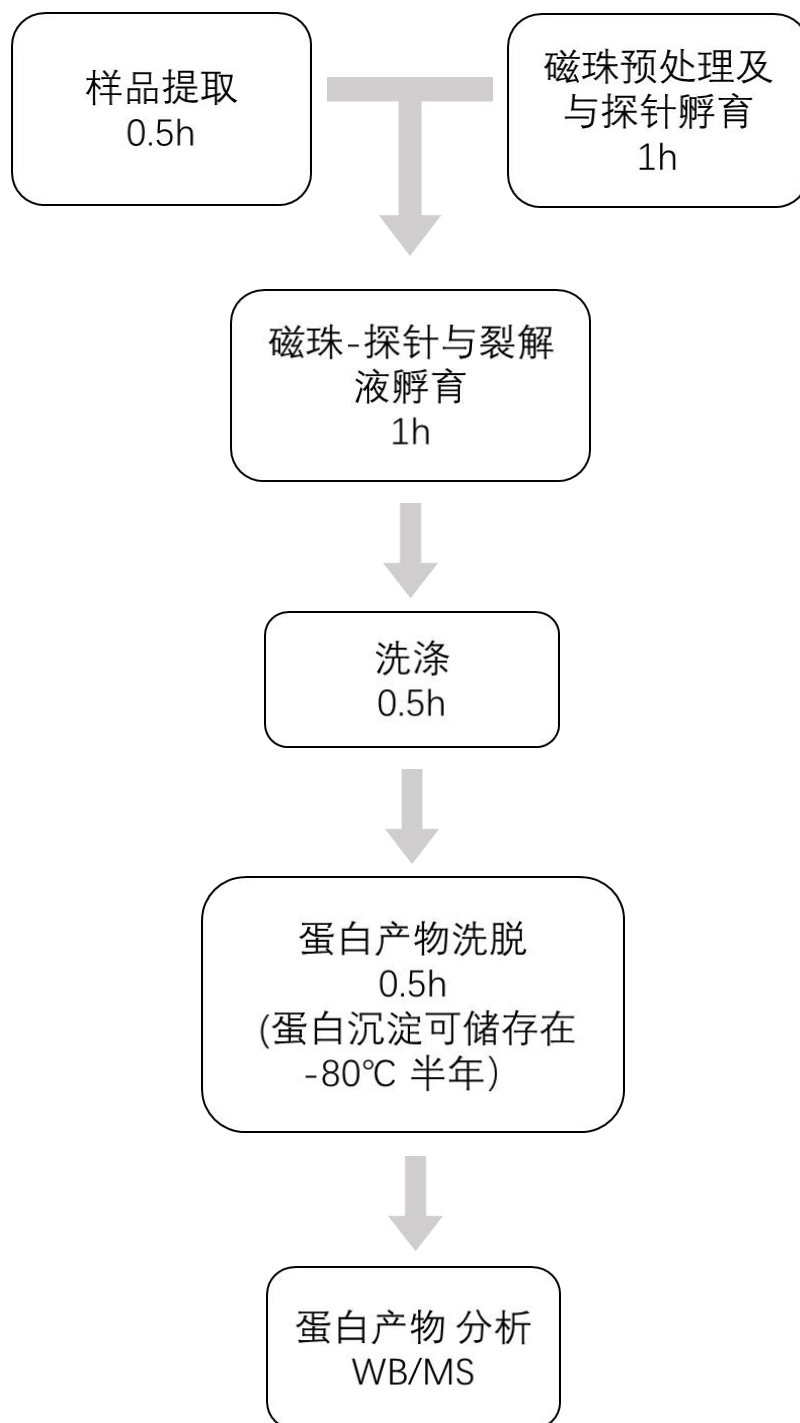
Positive RNA probe（阳性对照探针）包含 AR RNA 的 3'UTR 区富含 UC 的区域，可特异性识别捕获 HuR 和 poly (C) 结合蛋白（CP1 和 CP2）。Negative RNA probe（阴性对照探针）是 Positive RNA probe 的反义序列，不含有 HuR 或 poly(C)BP 结合位点。Positive RNA probe 包含以下序列：

5'-CUGGGCUUUUUUUUCUCUUUCUCUCCUUUCUUUUUCUUCUCCCUCUCCUA-3'。

## 实验操作流程图



## 实验时间管理



---

## 实验前准备

### 1. 探针制备

- 1) 体外转录或合成方法制备靶 RNA 和阴性对照探针。末端标记探针相对于随机标记探针更加有利于探针自身二级结构的正确折叠以及与蛋白的结合；
- 2) 实验前 RNA 探针是否需要二级结构的折叠矫正，请咨询相应厂家。

#### 注意事项：

- a) 本试剂盒适用长链、线性 Biotin 标记的 RNA 探针直接拉取蛋白的实验目的。短链探针未做测试，不保证实验效果；
- b) 阴性对照探针可选用靶 RNA 的反义序列或是无义序列；
- c) 不适用反义 RNA 探针纯化 (RAP) 技术 (将与目标 RNA 互补的寡核苷酸生物素标记探针，并由此捕获相关互作蛋白和 RNA) 。

### 2. RNase 控制

在整个实验中，应采取所有标准预防措施以尽量减少 RNase 污染。如所有步骤都应戴手套，所有接触细胞或细胞裂解物的仪器、玻璃器皿和塑料器皿应经认证的无核酸酶或应使用 DEPC 或其他 RNase 灭活试剂进行预处理。试剂盒含有 RNase 抑制剂，请按协议中说明进行添加操作。

### 3. 细胞样品准备

#### 1) 贴壁细胞

##### ● 刮取细胞

- ①从培养皿或培养板上刮下细胞，转移到离心管，细胞计数；
- ②1000 rpm 离心 5 分钟收集细胞，弃上清，用预冷的 PBS 洗涤细胞两次；
- ③4°C，1000 rpm 离心 5 分钟收集细胞，弃上清（可放-80°C保存）。

##### ● 消化液消化收取细胞

- ①弃掉培养基，用 PBS 冲洗细胞一次；
- ②加胰蛋白酶消化解离细胞；
- ③加 10 倍体积的完全细胞培养基终止消化，收集细胞计数，转移到离心管；
- ④1000 rpm 离心 5 分钟收集细胞，弃上清，用预冷的 PBS 洗涤细胞两次；
- ⑤4°C，1000 rpm 离心 5 分钟收集细胞，弃上清（可放-80°C保存）。

## 2) 悬浮细胞

- ①将细胞收到锥形管中，细胞计数；
- ②1000 rpm 离心 5 分钟收集细胞，弃上清；
- ③将细胞重悬在预冷的 10ml PBS 中清洗。4°C，1000 rpm 离心 5 分钟收集细胞，弃上清；
- ④重复步骤 3（可放置-80°C保存）。

### 注意事项：

保存时间不宜过久，新鲜的样本有利于 pull-down 实验的成功。

## 4. 自备材料准备

自备仪器耗材	自备试剂
匀浆器（组织样本使用）	PBS 缓冲液（RNase free）
RNase free 离心管/枪头	靶 RNA 探针（生物素标记） (GENESEED® T7 Biotin Labeled RNA Synthesis Kit, R0402)
低温离心机	阴性对照探针（生物素标记，可选项）
磁力架	目标蛋白抗体（如目标蛋白已知）
涡旋器	DEPC 水

## 5. 试剂准备

试剂编号	名称	使用说明	一次实验使用量
<b>【1】</b>	10× Capture Buffer	每次使用前混匀，用 DEPC 水稀释为 1×，4°C保存，当日使用。	5.1 mL (1×)
<b>【2】</b>	10× Wash Buffer	每次使用前混匀，用 DEPC 水稀释为 1×，4°C保存，当日使用。	10 mL (1×)

## 实验操作

### 1. 样品提取

#### ● 组织样品

- 1) 取 100 mg 新鲜组织，使用预冷的 PBS（自备）洗涤，去除血液等；
- 2) 将洗净组织放入匀浆器，加入 1 mL 预冷的 Capture Buffer (1×)，10 μL RNase 抑制剂 **【3】** 和 10 μL 蛋白酶抑制剂 **【4】**，于冰上充分研磨后转置于 1.5 mL RNase free 离心管中；
- 3) 4°C，12,000×g 离心 10 min，取上清；
- 4) 取 50 μL 上清作为 Input 样本（标记为 Input 管），剩余上清置于 RNase free 离心管



---

中，尽快进行后续实验，或-80℃短期保存。

## ● 细胞样品

- 1) 向  $1 \times 10^7$  个细胞沉淀中加入 1 mL 预冷的 Capture Buffer (1×)，10 μL RNase 抑制剂【3】和 10 μL 蛋白酶抑制剂【4】，吹打混匀，置于冰上裂解 10 min，其间涡旋 2 次，每次 5 s；
- 2) 4℃，12,000×g 离心 10 min，取上清；
- 3) 取 50 μL 上清作为 Input 样本（标记为 Input 管），剩余上清置于 RNase free 离心管中，尽快进行后续实验，或-80℃短期保存。

### 注意事项：

- a) RNase 抑制剂【3】应在冰上融化后使用，蛋白酶抑制剂【4】应在室温融化后使用；
- b) 使用 RNase free 的吸头及离心管，尽量降低环境中 RNase 对实验的影响；
- c) 组织样品离心后取上清，应避免吸取到脂肪等不溶杂质；
- d) 使用细胞样本进行实验时，应避免细胞量过多，防止核酸析出聚集成团；
- e) 对于低表达丰度的蛋白，样本量可适当增加至  $3 \times 10^7$  个细胞，步骤 2（磁珠预处理）中磁珠用量可适当增加至 100 μL；
- f) 合理安排实验时间，可在步骤 3（磁珠与探针孵育）期间完成样品处理，避免反复冻融样品发生降解。

## 2. 磁珠预处理

- 1) 取一新的 1.5 mL RNase free 离心管，加入 50 μL Streptavidin Magnetic Beads【5】和 1 mL Capture Buffer (1×)。涡旋 5 s，置于磁力架弃上清；
- 2) 加入 1 mL Capture Buffer (1×)，涡旋 5 s，置于磁力架弃上清；
- 3) 加入 1 mL Capture Buffer (1×)，充分混匀后等分为 2 份，各 500 μL；分别标记为 RPD 管（RNA Pull-Down 组）和 NRPD 管（Negative RNA Pull-Down 组）。

## 3. 磁珠与探针孵育

- 1) 经预处理的两管磁珠分别加入 50 pmol 目的探针 (RPD 管) 或 50 pmol 对照探针 (NRPD 管)，于 4℃，10 转/min 旋转反应 30 min；
- 2) 反应完成后，置于磁力架弃上清；
- 3) 两管中分别加入 0.5 mL Capture Buffer (1×) 涡旋洗涤 5 s，置于磁力架弃上清。

### 注意事项：

- a) 使用的探针应带有生物素标记，可通过体外转录或人工合成获得；
- b) 探针使用量推荐 50 pmol/次，或根据实际实验情况调整用量；

- 
- c) 试剂盒提供的 Positive RNA probe 【7】 和 Negative RNA probe 【8】，如需使用，建议同时开展实验，每次实验推荐使用探针量为 2  $\mu$ L，使用前冰上融解混匀；
  - d) 试剂盒中提供的对照探针和抗体，可以满足 4 ~ 5 次 RNA pull-down。

#### 4. 磁珠-探针与裂解液孵育

- 1) 向 RPD 管和 NRPD 管的磁珠中分别加入组织或细胞裂解上清 450  $\mu$ L，4 $^{\circ}$ C、10 转/min 旋转反应 1 h；
- 2) 反应完成后，置于磁力架弃上清。

#### 5. 洗涤

- 1) 取 10 mL Wash Buffer (1 $\times$ ) 置于 RNase free 离心管中，加入 1  $\mu$ L RNase 抑制剂 【3】 和 1  $\mu$ L 蛋白酶抑制剂 【4】，制备得到 Wash Buffer (1 $\times$ ) 【2】 工作液\*，置于冰盒上备用；
- 2) 在收集的磁珠中加入 1 mL Wash Buffer (1 $\times$ ) 工作液\*，涡旋洗涤 1 min，置于磁力架弃上清；
- 3) 重复步骤 2) 涡旋洗涤 3 ~ 4 次；
- 4) 磁力架弃上清，收集磁珠。

#### 6. 蛋白产物洗脱

- 1) 向 Input 管中加入 50  $\mu$ L 5 $\times$  Loading Buffer 【6】；
- 2) 向 RPD 管和 NRPD 管中分别加入 30 ~ 50  $\mu$ L 的 5 $\times$  Loading Buffer 【6】，混匀；
- 3) Input、RPD 和 NRPD3 组蛋白样本，于 100 $^{\circ}$ C 水煮 10 min，3000 rpm 离心 1 min，收集上清，-80 $^{\circ}$ C 保存；
- 4) 获得的产物可直接用于 Western Blot 检测或质谱检测。

#### 注意事项：

- a) 使用本试剂盒提供的对照探针进行 RNA pull-down 实验，可以使用试剂盒提供的 HuR Antibody (Rabbit) 【9】 对产物进行 Western Blot 检测，抗体稀释比例 1:1000，预测大小 36KDa；
- b) 使用其他生物素标记的探针时，根据实验需求选择抗体进行 Western Blot 检测，抗体使用需参考对应说明书；
- c) Loading Buffer 会影响蛋白浓度直接测量的准确性，建议直接取 20 $\mu$ L 进行 WB 检测（如靶蛋白已知且有相应抗体的情况下）。剩余产物可再做一次质谱分析，一般质谱公司可以处理加了 Loading Buffer 的蛋白样品；
- d) 如果产物量不够下游实验要求，可以重复实验，合并产物。

## 结果展示

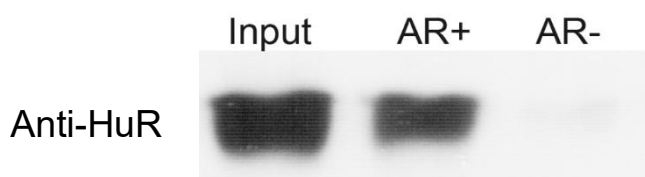


图 AR+探针特异性捕获 HuR 蛋白

## 常见问题及处理方法

问题	原因	建议解决方案
WB 检测结果异常, 条带不符或无	条带信号不足	增加或减少样本量 (样本量过多, 裂解不充分, 无法有效释放靶蛋白); 增加抗体用量。
	抗体质量较差	用裂解物预检抗体质量; 更换其它品牌抗体
	靶蛋白内源表达过低	增加样本量或做靶蛋白过表达
	非特异性结合蛋白条带过多	优化孵育时间、洗涤次数、探针与裂解物的比率
	蛋白降解	使用新鲜或冻存时间不长的样本

## 参考文献

1. Guttman M, Rinn JL (2012). Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature* 482:339-346
2. Ponting CP, Oliver PL, Reik W (2009). Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell* 136:629-641
3. Yeap, Bu. B., *et al.* (2002). Novel binding of HuR and Poly(C)-Binding Protein to a conserved UC-rich motif within the 3' untranslated region of the androgen receptor messenger RNA. *J Biol Chem* 277:27183-92.

