Waals™ RNA Pull-down Kit, RP01-20T

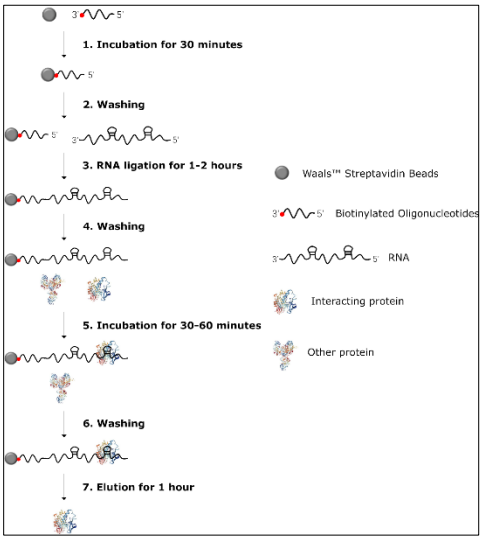
操作说明

- **描述：**Waals™ RNA Ligation Kit，包含 Biotinylated Oligonucleotides, DMSO, RNase Inhibitor, T4 RNA Ligase, 10 × RNA Ligase Reaction Buffer, 30% PEG, Nuclease-free H_2O. Waals™ RNA Pull-down Kit，包含 Waals™ Streptavidin Beads, 20mM Tris, 1 × RNA Capture Buffer, 10 × RNA-Protein Binding Buffer, 50% glycerol, 1 × Wash Buffer, Nuclease-free H_2O, Elution Buffer. 试剂盒各提供 20 次反应的试剂。
- **试剂盒储存：**Waals™ RNA Ligation Kit, -20℃储存; Waals™ RNA Pull-down Kit，4℃储存（勿冷冻）。
- **介　绍**

Waals™ RNA Pull-down Kit 提供链霉亲和素磁珠与生物素标记的寡核苷酸结合；通过 Waals™ RNA Ligation Kit 提供的试剂将目的 RNA 与寡核苷酸连接，进而与样品蛋白孵育形成 RNA-蛋白复合物，通过磁珠分离可高效富集与目的 RNA 相互作用的蛋白。通过 Elution 洗脱后可进行 SDS-PAGE、银染、质谱、免疫印迹等分析。

Waals™ RNA Ligation Kit 提供 T4 RNA 连接酶在特殊反应体系中将目的 RNA 与寡核苷酸连接。由于寡核苷酸已与磁珠结合，所以目的 RNA 不会与寡核苷酸混连，几乎不影响 RNA 的结构。试剂盒提供的方法获得的 RNA pull-down 产物可用于后续的银染、质谱、免疫印迹等实验。

操作流程



RNA Pull-down 实验流程图

- **细胞裂解及注意事项**

1. 用标准的蛋白裂解 buffer (e.g., Waals™ IP Lysis Buffer)并加入蛋白酶抑制剂处理细胞。

2. 蛋白的浓度应大于 2mg/mL，以确保在 RNA Pull-down 实验中蛋白量充足。
3. 确保蛋白为新鲜提取蛋白且无细菌等污染。

■ **磁珠准备**

1. 重悬磁珠，吸取 50μL 至无酶离心管中。
2. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
3. 用 50μL 20 mM Tris 重悬磁珠。
4. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
5. 重复步骤 3 和 4。
6. 用 50μL 1 × RNA Capture Buffer 重悬磁珠。

■ **磁珠与生物素标记核苷酸反应**

1. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
2. 用 50μL 1 × RNA Capture Buffer 重悬磁珠。
3. 加入 1μL Biotinylated Oligonucleotides (50 pmol)，室温**旋转**孵育 30 分钟。
4. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
5. 加入 100μL 无菌无酶水，重悬磁珠。
6. 重复步骤 4 和 5。

■ **RNA 连接**

加入 3μL DMSO 于装有 5μL 目的 RNA（~ 50 pmol）的离心管中并混匀，置于 85℃孵育 5 分钟，立即置于冰上冷却，以打开 RNA 二级结构并用于后续实验。

用 Waals™ RNA Ligation Kit 提供的试剂按照下表配制 **RNA Ligation Mix**:

试剂名称	体积 (μL)	终浓度
10 × RNA Ligase Reaction Buffer	3	1 ×
RNase Inhibitor	1	40 U
Control RNA or Test RNA	8	50 pmol
T4 RNA Ligase	1	40 U
Nuclease-free H_2O	2	
30% PEG	15	15%
	30	

➢ **备注：30% PEG 须最后加入并充分混匀。**

1. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
2. 将 **30 μL RNA Ligation Mix** 加入离心管中，温和混匀。

3. 室温**旋转**反应 2 - 4 小时。
4. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
5. 将 10 × RNA-Protein Binding Buffer 稀释为 1 ×，即加入 30μL 10 × RNA-Protein Binding Buffer 至 270μL 无菌无酶水中，混匀。
6. 加入 100μL 1 × RNA-Protein Binding Buffer，温和重悬。
7. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
8. 重复步骤 6 和 7。

- 加入 100μL 1 × RNA-Protein Binding Buffer 于离心管中，温和重悬。
- **RNA Pull-down**

用 Waals™ RNA Pull-down Kit 提供的试剂按下表配制 **RNA Pull-down Mix**:

试剂名称	体积 (μL)	终浓度
10 × RNA-Protein Binding Buffer	10	1 ×
50% glycerol	30	-
Lysate (protein conc. >2mg/mL)	20 - 40	> 40 μg
Nuclease-free water	to 100	-
	100	

1. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
2. 将 100μL **RNA Pull-down Mix** 加入离心管中，温和重悬。
3. 室温**旋转**反应 30 - 60 分钟或 4℃**旋转**反应过夜。
4. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠，将上清液转入新的离心管，可用于后续分析。
5. 加入 100μL 1 × Wash buffer，温和重悬。
6. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠弃掉上清液。
7. 重复步骤 5 和 6，2 次。
8. 加入 100μL 1 × Wash buffer，温和重悬。
9. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠，将上清液转入新的离心管，可用于后续分析，以评估是否洗净。
10. 加入 50μL Elution buffer 至离心管中，充分混匀。
11. 室温**旋转**反应 30 - 60 分钟。
12. 将离心管置于磁力架上，收集上清液至新的离心管中，用于后续实验。

实验相关问题：

问题	可能原因	解决方案
1. RNA 降解	有 RNA 酶污染	采用无酶试管，反应中加入 RNA 酶抑制剂，操作中注意避免 RNA 酶污染
2. 非特异性蛋白较多	磁珠非特异性吸附蛋白	加入 0.1 - 0.5 mg/mL BSA 溶液封闭磁珠非特异性吸附
	洗涤不充分	增加洗涤次数
3. 未检测到目的蛋白	蛋白质降解或污染	确保蛋白质为新鲜提取，未污染的蛋白质
	蛋白质含量不够	增加蛋白含量
	蛋白抗体问题	增加对照实验检测蛋白抗体是否有效，且检测灵敏度是否足够
	蛋白裂解不充分或过度	更换合适的蛋白裂解液
	洗脱不充分	可增加 Elution buffer 洗脱时间