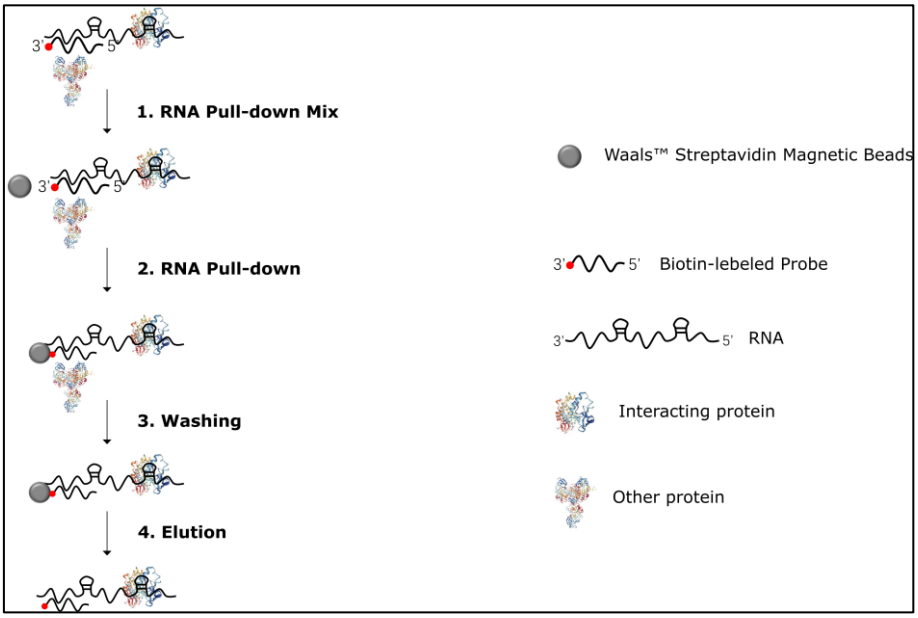
Waals™ RNA Pull-down Kit, RP02-20T

操作说明

- **描述：**Waals™ RNA Pull-down Kit，包含 Streptavidin Magnetic Beads, 20 mM 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 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。客户需自备生物素标记的探针。生物素标记的探针与样品中的目的 RNA 结合，通过磁珠分离可高效富集目的 RNA 结合的蛋白。通过 Elution 洗脱后，产物可进行 SDS-PAGE、银染、质谱、免疫印迹等分析。

操作流程



RNA Pull-down 实验流程图

- **细胞裂解及注意事项**

1. 用标准的蛋白裂解液（e.g., Waals™ RNA IP (RIP) Lysis Buffer, RILB01-100mL）裂解细胞，在裂解细胞之前应加入蛋白酶抑制剂（Protease Inhibitor Cocktail）和 RNA 酶抑制剂（RNase Inhibitor）。
2. 蛋白的浓度应大于 2mg/mL，以确保在 RNA Pull-down 实验中样品含量充足。
3. 确保样品为新鲜提取样品且无细菌或其他污染。

- **RNA Pull-down Mix 制备**

1. 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. >5μg/μL)	20 - 40	> 100 μg
Biotin-labeled Probe		10 - 50 (nM)
Nuclease-free water	to 100	-
	100	

2. 将 **RNA Pull-down Mix** 在 4℃**旋转**孵育 2-4 小时或过夜。

■ **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，收集磁珠并弃掉溶液。
3. 用 50μL 20 mM Tris 重悬磁珠。
4. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉溶液。
5. 重复步骤 3 和 4。
6. 用 50μL 1 × RNA Capture Buffer 重悬磁珠。

■ **RNA Pull-down**

1. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉溶液。
2. 将已孵育的 **RNA Pull-down Mix** 加入离心管中，温和重悬。
3. 在室温**旋转**反应 1-2 小时，或在 4℃**旋转**反应 2-4 小时。
4. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠。(可选：将上清液转入新的离心管用于后续分析)。
5. 加入 100μL 1 × Wash Buffer，温和重悬。
6. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠弃掉溶液。
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。(可选：将上清液转入新的离心管用于后续分析)。

■ **洗脱（有两种方式）**

➢ **非变性洗脱**

1. 加入 50μL Elution Buffer 至离心管中，充分混匀。
2. 室温**旋转**反应 30 - 60 分钟。
3. 将离心管置于磁力架上，收集溶液至新的离心管中，用于后续实验。

➢ **变性洗脱**

1. 加入 50μL 含有 Protein Loading Buffer 的裂解液，充分混匀。
2. 在 100℃孵育 10 分钟。
3. 将离心管置于磁力架上，收集溶液至新的离心管中，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