

RNA-Protein Pull-Down Kit with Streptavidin Agarose

产品编号	产品名称	包装
P1811S	RNA-Protein Pull-Down Kit with Streptavidin Agarose	20次

产品简介:

- 碧云天的RNA-Protein Pull-Down Kit with Streptavidin Agarose, 即RNA-蛋白质沉淀试剂盒(链霉亲和素琼脂糖凝胶), 简称RNA Pull-Down Kit, 是一种新型、高效地基于对感兴趣RNA进行生物素或脱硫生物素(Biotin/Debiotin)标记, 随后与链霉亲和素琼脂糖凝胶结合, 用于富集相应的RNA结合蛋白(RNA-binding proteins, RBPs)的试剂盒。本试剂盒可用于研究已知RNA与拟发现的目标蛋白之间的相互作用, 或用于确认已知RNA与已知蛋白的相互作用。
- 转录水平对于真核生物基因表达至关重要, 但mRNA水平并不总是与蛋白质的水平直接相关, 这种差异的部分原因是mRNA的转录后调控[1]。转录后调控的关键是RBP及其相关mRNA靶标的相互作用, RBP通过与mRNA靶标形成核糖核蛋白(Ribonucleoprotein, RNP)复合体来影响mRNA的定位、修饰、稳定性和翻译水平[2]。研究发现, 随着原核生物向真核生物的进化和核膜的发育, RBP的数量显著增加, 转录后的基因表达研究往往集中于RBP。从RNP的复合物中识别这些未知的RBP, 对于理解RNP的机制和功能及其对蛋白质表达水平的影响至关重要。目前研究RNA-蛋白质相互作用的方法分为两大类。一类以感兴趣的蛋白质为出发点, 寻找与该蛋白质结合的RNA, 如碧云天的BeyoRIP™ RIP Assay Kit (P1801/P1805); 另外一类是以感兴趣的RNA (包括非编码RNA和mRNA)为出发点, 寻找与该RNA结合的蛋白质[3], 如本试剂盒, 将感兴趣的RNA带上生物素或脱硫生物素等标签, 通过该标签使RNA结合到树脂等支持物上, 再加入蛋白质样品与RNA结合, 洗涤、洗脱得到与目标RNA结合的蛋白质, 最后通过Western、质谱分析或蛋白测序等方法进行鉴定。
- 本试剂盒提供的Streptavidin Agarose (链霉亲和素琼脂糖凝胶)可以高度特异性地与生物素或脱硫生物素标记的RNA结合, 然后加入蛋白样品在平衡缓冲液中进行孵育以结合目标蛋白, 洗涤去除未结合的组分, 最后使用相应的洗脱液进行洗脱。本试剂盒的实验流程和原理图如1所示。

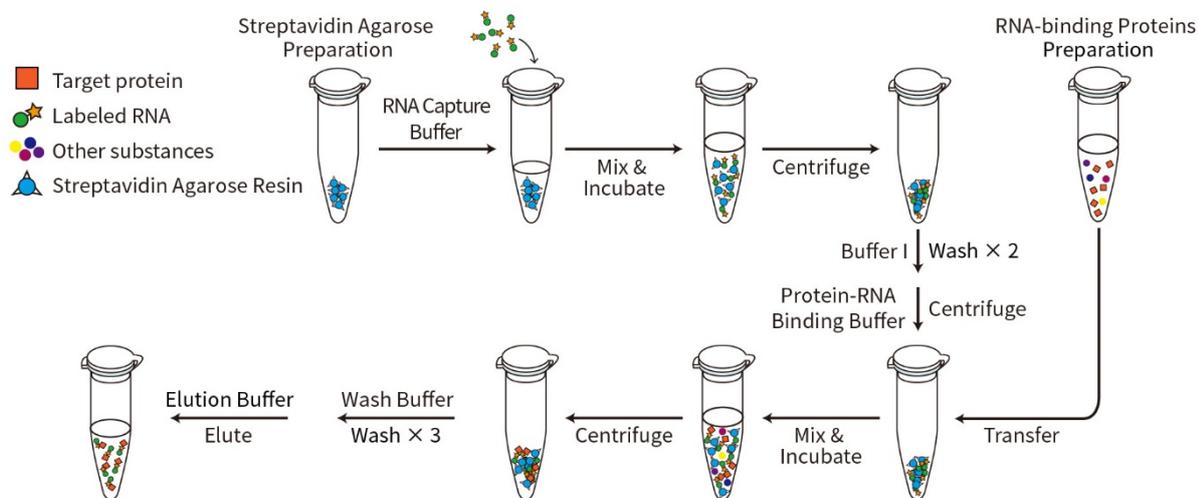


图1. 碧云天的RNA-Protein Pull-Down Kit with Streptavidin Agarose (P1811)的实验流程和原理示意图。

- **本试剂盒特异性强。**本试剂盒使用的Streptavidin Agarose (链霉亲和素琼脂糖凝胶), 由高质量的链霉亲和素(Streptavidin, SA)与高度交联的6%琼脂糖共价偶联而成, 能够快速、高效、灵敏、特异性地与生物素或脱硫生物素标记的RNA、抗体、核酸、蛋白、多肽、凝集素等分子结合。获得的产物纯度高, 可进一步用于Western、ELISA、质谱分析、蛋白测序等一系列后续的分析测试。碧云天同时提供磁珠法的RNA-Protein Pull-Down Kit with Streptavidin Magnetic Beads (P1815)。
- **本试剂盒简单、可靠、快速、方便。**本试剂盒提供了RNA-Protein pull-down实验所需所有试剂, 操作简单, 一次完整的pull-down实验仅需4小时完成, 经过多种蛋白与标记探针的测试, 实验重复性高, 结果可靠。
- **本试剂盒兼容性强。**本试剂盒提供了两种洗脱液, 生物素洗脱液(Biotin Elution Buffer)是一种高盐溶液, 适用于在严苛的条件下进行的生物素标记RNA的洗脱; 脱硫生物素洗脱液(Debiotin Elution Buffer)适用于在温和的条件下进行竞争性洗脱, 无需使用高盐、高温、强酸、强碱等严苛的条件, 最大程度地保护了RNA结合蛋白的活性, 适合用于脱硫生物素标记RNA的洗脱。脱硫生物素是一种单环无硫的生物素类似物, 和生物素相比, 与链霉亲和素结合的特异性几乎相等, 但亲和力较低, 可在温和的条件下使用含生物素的洗脱液竞争性置换与链霉亲和素结合的脱硫生物素标记物。本试剂盒用于RNA结合蛋白HuR (Human antigen R)蛋白的pull-down效果请参考图2。

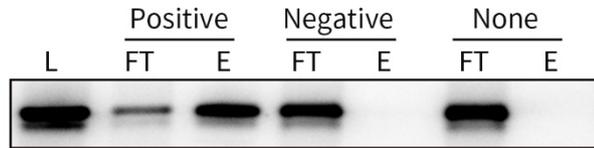


图2. 碧云天RNA-Protein Pull-Down Kit with Streptavidin Agarose (P1811)用于沉淀HuR蛋白的效果图。HeLa细胞(每个沉淀反应相当于20-100万个细胞量)制备成用于pull-down的裂解液。L (Lysate load)为Input, 即全细胞裂解液; FT (Flow-through)为结合后的上清样品; E (Eluate)为洗脱样品。阳性对照脱硫生物素标记探针(Positive)为雄激素受体(Androgen receptor, AR) RNA的3'非翻译区(Untranslated regions, UTR), 含有HuR结合位点。阴性对照脱硫生物素标记探针(Negative)为不含HuR结合位点的25nt poly (A) RNA。图中可见HeLa细胞裂解液与阳性对照标记探针(Positive)孵育可富集HuR蛋白; 仅与阴性对照标记探针(Negative)或链霉亲和素琼脂糖凝胶孵育(None)都不能富集HuR蛋白。Western检测用的HuR抗体为BeyoRIP™ Antibody and Primers for HuR RIP Assay (P1821)中的HuR Rabbit Monoclonal Antibody。Western印迹成像由BeyoImager™ 600化学发光成像系统(EI600)完成。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

➤ 按照使用说明操作, 本试剂盒小包装可以进行20次检测。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P1811S-1	Streptavidin Agarose	1ml
P1811S-2	Buffer I	45ml
P1811S-3	RNA Capture Buffer	2ml
P1811S-4	Lysis Buffer	5ml
P1811S-5	PMSF (100mM)	50μl
P1811S-6	RNA-Protein Binding Buffer (10X)	500μl
P1811S-7	50% Glycerol	1ml
P1811S-8	Wash Buffer	50ml
P1811S-9	Biotin Elution Buffer	1.5ml
P1811S-10	Desthiobiotin Elution Buffer	1.5ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存, 一年有效。

注意事项:

- 操作过程要严格保证无RNase污染。请戴上口罩和手套操作, 尽量防止人体表面的RNase污染样品。操作时应避免对着样品或所使用的试剂盒或耗材呼气或说话, 以防RNase污染。对于操作环境中RNase的去除, 推荐使用碧云天生产的RNase and DNase Away (R0123)以去除实验桌、仪器设备表面或其它接触面上的RNase。
- 所用试剂和耗材都要求是RNase-free, 操作时应小心, 避免被污染。如果耗材可能有RNase污染, 可考虑用0.01%的DEPC水溶液浸泡过夜, 然后高温高压灭菌并烘干。
- 为确保在操作中蛋白质不被降解, 需在使用说明中的标注之处加入PMSF。所有步骤尽量在冰上, 以降低可能的蛋白酶活性。如有必要请自行准备蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、去乙酰化酶抑制剂等, 例如蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(通用型, 50X) (P1045/P1046)和去乙酰化酶抑制剂混合物(100X) (P1112/P1113)。
- Streptavidin Agarose使用前要适当充分重悬, 即颠倒若干次使琼脂糖凝胶混合均匀, 混匀操作须轻柔, 不宜剧烈涡旋震荡等, 避免蛋白变性、琼脂糖凝胶破碎等。
- 须注意洗脱液的选择, 生物素标记使用Biotin Elution Buffer, 脱硫生物素标记使用Desthiobiotin Elution Buffer; 若样品用于Western检测, 可直接用SDS-PAGE蛋白上样缓冲液进行洗脱处理。
- 用于pull-down最终效果检测的抗体, 可先通过Western验证抗体是否可以应用于裂解液中目标蛋白的检测, 然后再进行pull-down获得的蛋白样品的Western检测。
- 本试剂盒仅提供了RNA-Protein pull-down实验所需所有试剂, 不提供RNA探针标记的相关试剂, 推荐使用碧云天3' End Biotin RNA Labeling Kit (R7065)或3' End Desthiobiotin RNA Labeling Kit (R7067)分别进行RNA的3'末端生物素或脱硫生物素标记, 非末端的生物素或脱硫生物素标记效果可能影响pull-down效果。如有需要, 也可以咨询碧云天RNA合成和3'标记的技术服务: https://www.beyotime.com/support/RNA_synthesis.htm。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

1. 标记探针与Streptavidin Agarose的结合。

由于Streptavidin Agarose储存在特殊保护液中, 所以需要在加入探针前适当洗涤, 每20-50μl Streptavidin Agarose悬浊液可结

合25-100pmol的标记探针。本使用说明以使用50pmol的标记探针加入到25µl Streptavidin Agarose悬浊液中为例。完整的pull-down通常包括Input组(仅细胞或组织的裂解液)、阴性对照组(阴性标记探针)、阳性对照组(阳性标记探针)、目的蛋白组(目标标记探针)和空白对照组(无探针)。

- a. 用移液器轻轻吹打重悬Streptavidin Agarose, 按照每60µl样品需25µl Streptavidin Agarose悬浊液, 取适量Streptavidin Agarose至一洁净离心管(FTUB306)中, 加入500µl Buffer I。如果使用的标记探针为100pmol, Streptavidin Agarose悬浊液的用量须提高至50µl, 样品和Buffer I的体积不变。
- b. 用移液器轻轻吹打重悬Streptavidin Agarose。4°C, 约1000×g离心1分钟, 去除上清。重复本洗涤步骤一次。
注: 多个样品时, 可以取总琼脂糖凝胶量合并洗涤处理后再平分到各个样品管中, 洗涤液用量须相应增加。
- c. 加入95µl RNA Capture Buffer和50pmol标记的RNA探针。轻轻重悬Streptavidin Agarose。
注: 如果发现目标蛋白富集效果不佳, 并且有可能存在RNase的污染, 从本步骤起所有涉及RNA探针的溶液体系, 都可以额外添加RNase Inhibitor, 以防止探针被环境中或蛋白样品中的RNase降解。
- d. 置于旋转混合仪上, 室温孵育15-30分钟。推荐使用BeyoVortex™基础型旋转混匀仪(E6800)。

2. 样品的制备。

通常一次pull-down反应(即使用一种标记探针进行一次pull-down)需要20-100万个细胞, 所需Lysis Buffer 40-200µl, 所需细胞量取决于目标RNA结合蛋白的表达丰度。用户可根据所研究的RNA结合蛋白的表达丰度的不同, 调整pull-down实验所使用的细胞量及对应的Lysis Buffer用量。本使用说明以一次pull-down反应需要使用30万个细胞, 所需Lysis Buffer 60µl为例进行说明。

- a. **细胞样品的制备。**对于贴壁细胞, 吸除细胞培养液, PBS洗涤一次; 对于悬浮细胞, 离心收集细胞后, PBS洗涤一次。如需细胞计数, 可在平行孔或皿中加入胰酶消化细胞或用细胞刮(FSCP023/FSCP029)刮离细胞后进行细胞计数。

(a) 一次pull-down反应按照每30万个细胞加入60µl Lysis Buffer的比例加入Lysis Buffer。用移液器吹打数下, 使Lysis Buffer和细胞充分接触以有效裂解细胞。

注: Lysis Buffer中需加入终浓度为1mM的PMSF。例如配制1ml Lysis Buffer, 需向Lysis Buffer中加入10µl 100mM PMSF。如有必要可以添加额外的蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂以及去乙酰化酶抑制剂等。

(b) 在冰浴上孵育5-10分钟, 以充分裂解细胞。

(c) 充分裂解后(对于贴壁细胞如有必要可以用细胞刮辅助收集细胞裂解液)将裂解液转移至1.5ml离心管中, 4°C, 13,000×g离心10分钟, 取上清即为制备好的细胞样品裂解液。取出60µl样品作为Input用于后续检测。Input须-80°C保存。

- b. **组织样品的制备。**通常按照3-6mg组织加入60µl Lysis Buffer的比例加入Lysis Buffer, 使用TissueMaster™高通量组织研磨仪(1.5/2ml×48) (E6618)、TissueMaster™手持式组织研磨仪(E6600/E6607)或玻璃匀浆器在约4°C或冰浴等低温条件下匀浆。将匀浆液在4°C, 13,000×g离心10分钟, 取上清即为制备好的组织样品裂解液。取出60µl样品作为Input用于后续检测。Input须-80°C保存。

注: Lysis Buffer中需加入终浓度为1mM的PMSF。例如配制1ml Lysis Buffer, 需向Lysis Buffer中加入10µl 100mM PMSF。如有必要可以添加额外的蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂以及去乙酰化酶抑制剂等。

3. RNA结合蛋白与标记探针的结合。

- a. 步骤1d孵育后的Streptavidin Agarose, 4°C, 约1000×g离心1分钟, 去除上清。
- b. 加入500µl Buffer I。用移液器轻轻吹打重悬Streptavidin Agarose。4°C, 约1000×g离心1分钟, 去除上清。重复本洗涤步骤一次。
- c. 将RNA-Protein Binding Buffer (10X)用超纯水稀释至1X, 每组加入100µl RNA-Protein Binding Buffer (1X), 用移液器轻轻吹打重悬Streptavidin Agarose。4°C, 约1000×g离心1分钟, 去除上清。
- d. 按照下表配制RNA-Protein结合反应的混合物(RNA-Protein Binding Mix)。如有必要, 可以额外添加RNase Inhibitor, 以避免RNA探针被蛋白样品中的RNase所降解。推荐使用RNase Inhibitor (R0102)、RNase Inhibitor, Murine (R0101)或RNase Inhibitor Plus, Human Placenta (R0105)。

Reagent	Volume	Adjustable Range
RNA-Protein Binding Buffer (10X)	10µl	5-20µl
50% Glycerol	30µl	0-50µl
Lysate (protein conc. >2mg/ml)	1-60µl	20-400µg
Ultrapure Water	To 100µl	-

e. 向步骤3c的Streptavidin Agarose中加入参考上表配制的100µl RNA-Protein Binding Mix, 轻轻吹打混合均匀。

f. 置于旋转混合仪上, 4°C孵育1-2小时。推荐使用BeyoVortex™基础型旋转混匀仪(E6800)。

注: RNA-Protein Binding Buffer (10X)为通用的缓冲液。当pull-down实验富集的蛋白效率很低或无蛋白时, 可以在此基础上额外添加盐, 如5M NaCl (DNase, RNase & Protease free, Sterile) (ST348), 添加的盐的浓度不宜过高, 建议盐的浓度≤1M。此外, 还可以通过优化孵育时间和温度以增强结合力和特异性。

4. 洗脱。

- a. 孵育结束后, 4°C, 1000×g离心1分钟收集上清, 该上清为没有结合标记探针的部分蛋白, 通过上清中未结合蛋白的多少可间接判断结合蛋白与Streptavidin Agarose上的标记探针的结合量。吸取上清时, 吸头不要触及底部沉淀。
- b. 使用500µl Wash Buffer重悬Streptavidin Agarose, 4°C, 1000×g离心1分钟, 小心收集上清, 收集的洗涤液上清可用于分析在洗涤的过程中有无结合蛋白的损失, 以供检测洗涤的效果。建议收集第一次洗涤液上清和最后一次洗涤液上清, 吸头不要触及底部沉淀。再重复本步骤三次。

- c. 生物素标记的RNA洗脱。加入**60μl Biotin Elution Buffer**重悬Streptavidin Agarose沉淀，**室温**摇床缓慢摇动**洗脱5分钟**，以洗脱生物素标记的RNA与目标蛋白形成的复合物。推荐使用BeyoVortex™基础型旋转混匀仪(E6800)。
注：Biotin Elution Buffer为高盐洗脱液，可能会对pull-down下来的蛋白有一定的影响，洗脱效率也可能不会特别高。
- d. 脱硫生物素标记的RNA洗脱。加入**60μl Desthiobiotin Elution Buffer**重悬Streptavidin Agarose沉淀，在**37°C**摇床缓慢摇动**洗脱30分钟**，以洗脱脱硫生物素标记的RNA与目标蛋白形成的复合物。推荐使用BeyoVortex™基础型旋转混匀仪(E6800)。
注：温度(37°C)对于样品的洗脱非常关键。
- e. 接步骤c或d，**4°C**，**1000×g离心1分钟**，收集洗脱液，吸头不要触及底部沉淀。获得的洗脱液中含有标记的RNA以及与其结合的目标蛋白。
注1：可以向洗脱后的Streptavidin Agarose沉淀中加入SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(1X) (P0015A/P0287)，95°C加热5-10分钟，以充分变性蛋白，可用于洗脱效果的检测。
注2：下游分析如果是蛋白测序或质谱，则可直接使用步骤4c/d的洗脱液进行分析；下游分析如果是通过Western检测目标蛋白，则可直接在步骤4b洗涤后的Streptavidin Agarose中加入60μl的SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(1X) (P0015A/P0287)重悬Streptavidin Agarose沉淀，95°C加热5-10分钟，充分变性并洗脱蛋白后进行Western检测。

参考文献：

1. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Mol Cell Biol. 1999. 19(3):1720-30.
2. Tenenbaum SA, Carson CC, Lager PJ, Keene JD. Proc Natl Acad Sci USA. 2000. 97(26):14085-90.
3. Bierhoff H. Methods Mol Biol. 2018;1686:241-250.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
P1811S	RNA-Protein Pull-Down Kit with Streptavidin Agarose	20次
P1815S	RNA-Protein Pull-Down Kit with Streptavidin Magnetic Beads	20次
P0635S	脱硫生物素标记和Pull-Down试剂盒(Agarose Resin)	5次
P0637S	脱硫生物素标记和Pull-Down试剂盒(Magnetic Beads)	5次
P0654S	生物素标记蛋白Pull-Down试剂盒(Agarose Resin)	25次
P0658S	生物素标记蛋白Pull-Down试剂盒(Magnetic Beads)	25次
P1801S	BeyoRIP™ RIP Assay Kit (Protein A/G琼脂糖)	22次
P1805S	BeyoRIP™ RIP Assay Kit (Protein A/G琼脂糖磁珠)	22次
P1821S	BeyoRIP™ Antibody and Primers for HuR RIP Assay	10次
P0015A	SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(1X)	10ml
R7065S	3' End Biotin RNA Labeling Kit	20次
R7067S	3' End Desthiobiotin RNA Labeling Kit	20次
R0101	RNase Inhibitor, Murine	2/10/50/200kU
R0102	RNase Inhibitor	2/10/50kU
R0105	RNase Inhibitor Plus, Human Placenta	2/10/50/200kU

Version 2025.01.10