

环状 RNA Pull-Down 试剂盒（动物）

circRNA Pull-Down Kit

产品信息

货号	产品名称	规格
FI8710-12T	circRNA Pull-Down Kit	12 次
FI8710-24T	circRNA Pull-Down Kit	24 次

产品描述

辉骏生物自主研发的 circRNA Pull-Down 试剂盒（已获得国家知识产权局发明专利授权），利用“F2 标签”与其特异性配体的强亲和力，高效调取细胞中的目标 circRNA 及其结合蛋白或结合 RNA。F2 标签是一段短的 RNA 序列，与目标 circRNA 连接后，几乎不影响其结构和功能。

实验前先将 F2 标签序列与目标 circRNA 序列连接，构建成 F2-circRNA 过表达载体，转染并裂解目的细胞，之后采用特异性配体磁珠来调取 F2-circRNA 及其结合蛋白或结合 RNA。去除未结合的物质后，洗脱蛋白质或提取 RNA 进行检测。

试剂盒组分

编号	名称	12T 规格	24T 规格	储存条件
①	磁珠	500 μ L	1 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
②	裂解缓冲液	7 mL	14 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
③	NT2 缓冲液	26 mL	52 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
④	漂洗液	32 mL	64 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
⑤	洗脱缓冲液	650 μ L	1.3 mL	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑥	F2 配体	250 μ L	500 μ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑦	蛋白酶抑制剂	230 μ L	460 μ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑧	RNase 抑制剂	65 μ L	130 μ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑨	10 mL 离心管	1 个	1 个	——

***注意：**该试剂盒包含足够完成 12 或 24 个反应的试剂，每个反应使用 40 μ L 磁珠。由于每次 pull-down 实验至少需要设置一个实验组和一个阴性对照组，因此一次实验至少需要使用 2 个反应的试剂量。

额外所需材料

1. 自备材料：F2-circRNA 过表达细胞、PBS、RNase-free 水、微量 RNA 提取试剂盒或提取 RNA 所需的材料【Trizol、氯仿、异丙醇、75%乙醇】。
2. 所需仪器：磁力架（辉骏产品货号 FI7101）、混匀仪、低温离心机、超声波破碎仪。

使用说明

I 注意事项

1. 请勿干燥或剧烈涡旋磁珠，禁止长时间置于磁场，这些操作可能会引起磁珠聚团，降低结合活性。
2. 为保证磁珠均匀分布，请在使用前通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀磁珠。
3. 请务必使用无 RNase 的实验材料：如离心管、枪头等。
4. 具体样品量和孵育时间依赖于每个特定体系，可能需要优化才能得到最大产量。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

II 实验前准备工作

F2-circRNA 过表达细胞制备

- (1) 将 F2 标签序列（GGCGCTGACAAAGCGCC）分为两部分，分别连在 circRNA 接口处首尾（例如 AAAGCGCC 连在 circRNA 头部，GGCGCTGAC 连在 circRNA 尾部），并将此序列构建至 circRNA 表达载体中，只有当载体上的 circRNA 在细胞内首尾连接成环后，才能在接口处形成完整的 F2 标签，避免了线性序列的干扰。
- (2) 表达载体转染目的细胞，细胞内会天然转录得到带 F2 标签的目标 circRNA（对照组用空载体表达细胞）。
- (3) qPCR 检测 F2-circRNA 的表达情况。

III 操作方法

1. 样本裂解

- (1) 实验组和对照组各取 2×10^7 个细胞，用预冷的 PBS（RNase-free）清洗细胞 2~3 次，每次 4°C 500 g 离心 5 min 收集细胞沉淀，彻底去除培养基成分；
- (2) 将样本置于冰上，每组加入 500 μ L 预冷的②裂解缓冲液、5 μ L ⑦蛋白酶抑制剂（按 1%添加）和 2.5 μ L ⑧RNA 酶抑制剂（按 0.5%添加），吹打混匀；
- (3) 为了更充分裂解，最好冰上超声至溶液基本澄清；若无超声条件，可置于冰上裂解 30 min，期间每 10 min 涡旋混匀一次，每次 5 s；
- (4) 4°C 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中；
- (5) 取 30 μ L 作为 input，剩余置于冰上备用或 -80°C 保存。

* 注意：i. 当样本不能完全裂解时（溶液很浑浊），可以增加裂解缓冲液或改善超声条件继续裂解。超声条件因样

本类型和超声设备而异，应提前摸索好。根据经验，样本蛋白浓度通常不低于 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，总量约 2~3 mg。

- ii. 如果样本中目标 F2-circRNA 或蛋白丰度较低，或结合物间的结合较弱，可以增加初始样本量，同时等比例增加裂解缓冲液和酶抑制剂的用量，但总孵育体积最大不超过离心管体积的 2/3，体积过大可以更换大规格离心管。

2. F2 配体磁珠制备

- (1) 将①磁珠上下颠倒混匀，取实验组和对照组一共所需的 80 μL 磁珠到新的离心管中；
- (2) 加入 1 mL ③NT2 缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (3) 重复上步操作 1 次；
- (4) 加入 400 μL ③NT2 缓冲液，上下颠倒重悬磁珠；
- (5) 加入 40 μL ⑥F2 配体，混匀仪上室温孵育 30 min；
- (6) 放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (7) 加入 1 mL ③NT2 缓冲液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (8) 重复上步操作一次；
- (9) 加入 600 μL ③NT2 缓冲液，上下颠倒重悬磁珠，将磁珠平分为两份，每组各约 300 μL ，转移到新的离心管中，记为实验组和对照组。

3. 漂洗液准备

为了防止实验过程中的蛋白和 RNA 降解，需要向漂洗液中添加蛋白酶抑制剂和 RNase 抑制剂。取出⑨10 mL 离心管，加入实验组和对照组总共所需的 5 mL ④漂洗液、25 μL ⑦蛋白酶抑制剂（按 0.5%添加）和 2.5 μL ⑧ RNase 抑制剂（按 0.05%添加），混合均匀，冰上保存，现配现用。如果有多组样本，请按照实际使用量配置。

4. circRNA pull-down

- (1) 将细胞裂解液（步骤 1 制备）加入相应组别的磁珠（步骤 2 制备）中，混匀仪上 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2~4 h；
- (2) 放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (3) 每组加入 500 μL 漂洗液（步骤 3 准备），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (4) 重复上步操作两次，共漂洗三次，保留磁珠。

5. 蛋白洗脱（选做）

如果需要对 pull down 产物进行蛋白检测，可以在以下方案中选择合适的洗脱方法。

- (1) 非变性洗脱法：向磁珠中加入 50 μL ⑤洗脱缓冲液，涡旋震荡 20 s，混匀仪上室温洗脱 10~15 min；涡旋震荡 20 s，1000 g 离心 20 s；放磁力架上静置 1 min，收集上清至新离心管中，-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。该洗脱产物保持原有的生物活性，适用于后期各种检测，例如质谱、SDS-PAGE 或 Western-blot 等。
- (2) SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法（变性洗脱法）：向磁珠中加入 50 μL 1 \times SDS-PAGE 上样缓冲液，95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min；磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中。该洗脱产物适用于 SDS-PAGE 或 Western Blot 检测；如果需要进行质谱检测，则切胶条后送检。

- * 注意:** i. 本试剂盒提供的洗脱缓冲液可以兼容质谱, 辉骏生物也可以提供蛋白的质谱检测服务。
- ii. 如果选择非变性洗脱法, 可以暂时保留洗脱后的磁珠, 当非变性洗脱效率较低时, 则采用 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法继续洗脱蛋白。
- iii. RNA pull-down 捕获的蛋白量通常较少, SDS-PAGE 建议用硝酸银染色, 染色步骤参考如下:
(为了便于称量, 每步配置的溶液体积较大, 实际操作时取适量溶液浸泡胶即可)
- (1) 固定: 30 min (乙醇: 乙酸: 水=4: 1: 5 体积比);
 - (2) 敏化: 30 min (乙酸钠 10.2 g, 硫代硫酸钠 0.471 g, 乙醇 45 mL, 加水至 150 mL);
 - (3) 水洗: 4 次, 每次 10 min;
 - (4) 银染: 30 min (硝酸银 0.375 g, 加水至 150 mL);
 - (5) 水洗: 2 次, 每次 40 s;
 - (6) 显色: 显影至条带清楚 (碳酸钠 3.75 g, 60 μ L 甲醛, 加水至 150 mL);
 - (7) 终止: 5 min (Na₂EDTA 2.19 g, 加水至 150 mL)。

6. RNA 提取纯化 (选做)

如果需要对 pull down 产物进行 RNA 检测, 可以购买微量 RNA 提取试剂盒或按照以下步骤提取 RNA。

- (1) 向磁珠中加入 1 mL Trizol, 室温静置 5 min, 4 °C 12000 g 离心 10 min, 取上清;
- (2) 加入 0.2 mL 氯仿, 涡旋混匀或猛烈晃动 15 s, 室温放置 2~3 min;
- (3) 4 °C 12000 g 离心 15 min, 吸取水相至新的无 RNase 离心管中 (约可吸取 0.5-0.55 mL);
- (4) 加入 0.5 mL 异丙醇, 颠倒数次混匀, 室温下沉淀 10 min 或 -20 °C 沉淀过夜;
- (5) 4 °C 12000 g 离心 10 min, 管底可见 RNA 沉淀, 弃上清;
- (6) 加入 1 mL 75%乙醇 (DEPC 水或 RNase-free 水配制);
- (7) 4 °C 12000 g 离心 10 min, 弃上清; 5000 g 快速离心 1 s, 小心吸尽液体;
- (8) 待 RNA 略干后, 加入 20 μ L DEPC 水或 RNase-free 水或溶解, -80 °C 保存或直接进行反转录。

- * 注意:** i. RIP 后的 RNA 一般较微量, 操作时注意勿把 RNA 沉淀吸走;
- ii. 切勿让 RNA 过分干燥, 否则将极难溶解, 且测出的 A260/280 值会低于 1.6。

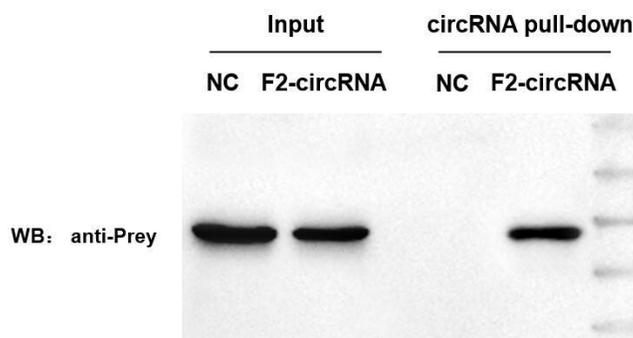
问题解决

问题	可能原因	解决方案
获得的蛋白复合物少	样本蛋白量不够	提高样本用量
	孵育时间不够	延长孵育时间 (如孵育过夜), 但需要注意孵育时间过长也可能导致非特异性结合增多
	RNA 探针量不够	提高 RNA 探针用量
获得的复合物杂蛋白多	非特异性的蛋白结合在磁珠上	增加漂洗时间和次数, 或样本预处理: 先与磁珠孵育, 去除非特异结合蛋白

使用案例

实验目标：检测细胞中的目标 circRNA 与待测蛋白（Prey）是否存在相互作用。

- (1) Input_NC: 空载对照组细胞的裂解液;
- (2) Input_F2-cirRNA: 过表达 F2-circRNA 细胞的裂解液;
- (3) circRNA pull-down_NC: 空载对照组细胞的 circRNA pull-down 产物;
- (4) circRNA pull-down_F2-cirRNA: 过表达 F2-circRNA 细胞的 circRNA pull-down 产物。



circRNA pull-down 产物的待测蛋白 WB 检测图