

货号	名称	规格	存储
F1510-12T	环状 RNA Pull-Down 试剂盒（动物）	12T	-20℃
F1510-24T	环状 RNA Pull-Down 试剂盒（动物）	24T	-20℃

产品简介

circRNA Pull-Down 试剂盒利用利用“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。

试剂盒成分

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

***注意：**该试剂盒包含足够完成 12、24 或 40 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、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 的离心管、枪头等实验材料。
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 μL 预冷的②裂解缓冲液、5 μL ⑦蛋白酶抑制剂(按 1%添加)和 2.5 μL 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 5s；

(4) 4°C 12000g 离心 15min，收集上清至新的离心管中；

(5) 取 30 μL 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，应提前摸索好合适的条件。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. 如果样本中目标蛋白或 RNA 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. 磁珠准备

(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 磁珠到新的无 RNase 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) 重复上步操作一次；

(4) 加入 400 μL ③NT2 缓冲液，上下颠倒重悬磁珠；

(5) 加入 40 μL ⑨F2 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 ，转移到新的无 RNase 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⑩10 mL 离心管，加入实验组和对照组总共所需的 5 mL ⑤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°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 ⑥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 20s，1000g 离心 20s；放磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中， -80°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 μ L 1 \times SDS-PAGE 上样缓冲液，95 $^{\circ}$ 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。

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，因此 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（Na₂ EDTA 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，请购买微量 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 $^{\circ}$ C 12000 g 离心 10 min，取上清；
- (2) 加入 0.2 mL 氯仿，涡旋混匀或剧烈晃动 15 s，室温放置 2~3 min；
- (3) 4 $^{\circ}$ C 12000g 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 $^{\circ}$ C 沉淀过夜；
- (5) 4 $^{\circ}$ C 12000g 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 $^{\circ}$ C 12000g 离心 10 min，弃上清；5000g 快速离心 1s，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 $^{\circ}$ C 保存或直接进行反转录。

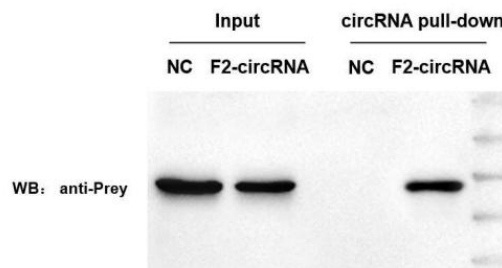
*** 注意：**i. Pull down 后的 RNA 一般较微量，操作时注意勿把 RNA 沉淀吸走；

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。

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