

说明书

circRNA pull-down 试剂盒（动物）

产品信息

货号	产品名称	规格
FI8710-12T	circRNA pull-down 试剂盒（动物）	12 次
FI8710-24T	circRNA pull-down 试剂盒（动物）	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。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。去除未结合的蛋白后，可以采用多种方法洗脱蛋白质。

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。
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, 请通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀瓶中磁珠。
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 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, 也可以置于冰上裂解 30 min, 间隔手动混匀;
- (4) 4°C 12000 g 离心 15 min, 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。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°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；
- (5) 每组加入 50 μL ⑤洗脱缓冲液，涡旋震荡 20 s，放混匀仪上室温洗脱 10~15 min；
- (6) 涡旋震荡 20 s，1000 g 离心 20 s，放磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中，-80°C 保存，或直接用于 Western-blot、SDS-PAGE 或质谱实验。

* 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. 洗脱后的磁珠暂时不要丢弃，如果洗脱效率低，可以更换 SDS-PAGE 上样缓冲液洗脱法：保留磁珠直接加入 20 μL 2 \times 上样缓冲液（125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20%甘油, 0.004%溴酚蓝）煮沸 3 min，放磁力架上静置 1 min，收集上清（即调取产物）；该洗脱产物可以用于 SDS-PAGE 或 Western-blot 实验，如果需要进行质谱实验，则切胶条后送样。
- iii. RNA pull-down 捕获的蛋白量通常较少，SDS-PAGE 建议用硝酸银染色而非考马斯亮蓝染色，银染步骤参考：

- (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 4.5 g, 72 μ L 甲醛, 加水至 180 mL);
- (7) 终止: 5 min (Na₂EDTA 2.19 g, 加水至 150 mL)。

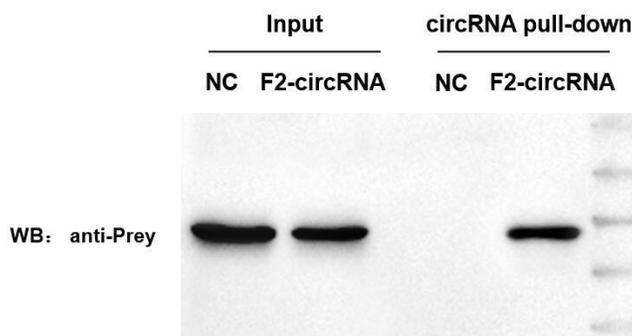
问题解决

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会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