



### RNA Ligation Kit

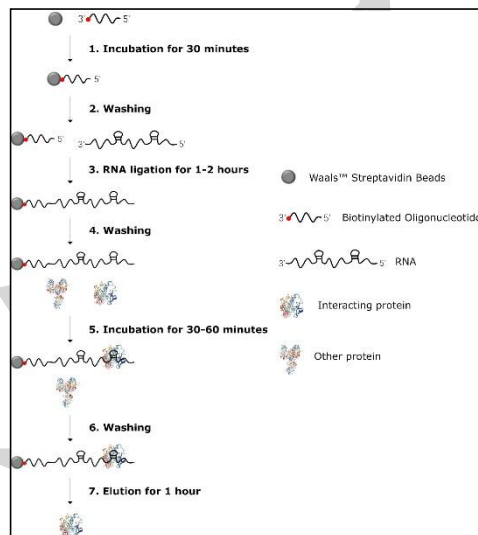
产品货号	产品名称	包装
DW1129	RNA Ligation Kit	20T

#### 产品简介:

RNA Pull-down Kit 提供链霉亲和素磁珠与生物素标记的寡核苷酸结合；通过 Waals™ RNA Ligation Kit 提供的试剂将目的 RNA 与寡核苷酸连接，进而与样品蛋白孵育形成 RNA-蛋白复合物，通过磁珠分离可高效富集与目的 RNA 相互作用的蛋白。通过 Elution 洗脱后可进行 SDS-PAGE、银染、质谱、免疫印迹等分析。

RNA Ligation Kit 提供 T4 RNA 连接酶在特殊反应体系中将目的 RNA 与寡核苷酸连接。由于寡核苷酸已与磁珠结合，所以目的 RNA 不会与寡核苷酸混连，几乎不影响 RNA 的结构。试剂盒提供的方法获得的 RNA pull-down 产物可用于后续的银染、质谱、免疫印迹等实验。

#### 操作流程:



#### 操作步骤:

##### 1. 细胞裂解及注意事项

1. 用标准的蛋白裂解 buffer (e.g., Waals™ IP Lysis Buffer) 并加入蛋白酶抑制剂处理细胞。
2. 蛋白的浓度应大于 2mg/mL，以确保在 RNA Pull-down 实验中蛋白量充足。
3. 确保蛋白为新鲜提取蛋白且无细菌等污染。

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

##### 3. 磁珠与生物素标记核苷酸反应

1. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。



2. 用 50 $\mu$ L 1  $\times$  RNA Capture Buffer 重悬磁珠。
3. 加入 1 $\mu$ L Biotinylated Oligonucleotides (50 pmol), 室温旋转孵育 30 分钟。
4. 将离心管置于磁力架上, 收集磁珠并弃掉上清液。
5. 加入 100 $\mu$ L 无菌无酶水, 重悬磁珠。
6. 重复步骤 4 和 5。

#### 4. RNA 连接

加入 3 $\mu$ L DMSO 于装有 5 $\mu$ L 目的 RNA (~ 50 pmol) 的离心管中并混匀, 置于 85 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟, 立即置于冰上冷却, 以打开 RNA 二级结构并用于后续实验。

用 RNA Ligation Kit 提供的试剂按照下表配制 RNA Ligation Mix:

试剂名称	体积 ( $\mu$ L)	终浓度
10 $\times$ RNA Ligase Reaction Buffer	3	1 $\times$
RNase Inhibitor	1	40 U
Control RNA or Test RNA	8	50 pmol
0.1% BSA	2	0.006%
T4 RNA Ligase	1	40 U
30% PEG	15	15%
	30	

备注: 30% PEG 须最后加入并充分混匀。

1. 将离心管置于磁力架上, 收集磁珠并弃掉上清液。
2. 将 30  $\mu$ L RNA Ligation Mix 加入离心管中, 温和混匀。
3. 室温旋转反应 2 - 4 小时。
4. 将离心管置于磁力架上, 收集磁珠并弃掉上清液。
5. 将 10  $\times$  RNA-Protein Binding Buffer 稀释为 1  $\times$ , 即加入 30 $\mu$ L 10  $\times$  RNA-Protein Binding Buffer 至 270 $\mu$ L 无菌无酶水中, 混匀。
6. 加入 100 $\mu$ L 1  $\times$  RNA-Protein Binding Buffer, 温和重悬。
7. 将离心管置于磁力架上, 收集磁珠并弃掉上清液。
8. 重复步骤 6 和 7。
9. 加入 100 $\mu$ L 1  $\times$  RNA-Protein Binding Buffer 于离心管中, 温和重悬。

#### 5. RNA Pull-down

用 Waals<sup>TM</sup> RNA Pull-down Kit 提供的试剂按下表配制 RNA Pull-down Mix:

试剂名称	体积 ( $\mu$ L)	终浓度
10 $\times$ RNA-Protein Binding Buffer	10	1 $\times$
50% glycerol	30	-
Lysate (protein conc. >2mg/mL)	20 - 40	> 40 $\mu$ g
Nuclease-free water	to 100	-
	100	

1. 将离心管置于磁力架上, 收集磁珠并弃掉上清液。
2. 将 100 $\mu$ L RNA Pull-down Mix 加入离心管中, 温和重悬。
3. 室温旋转反应 30 - 60 分钟或 4 $^{\circ}$ C 旋转反应过夜。
4. 将离心管置于磁力架上, 收集磁珠, 将上清液转入新的离心管, 可用于后续分析。
5. 加入 100 $\mu$ L 1  $\times$  Wash buffer, 温和重悬。
6. 将离心管置于磁力架上, 收集磁珠弃掉上清液。



7. 重复步骤 5 和 6, 2 次。
8. 加入 100 $\mu$ L 1  $\times$  Wash buffer, 温和重悬。
9. 将离心管置于磁力架上, 收集磁珠, 将上清液转入新的离心管, 可用于后续分析, 以评估是否洗净。
10. 加入 50 $\mu$ L Elution buffer 至离心管中, 充分混匀。
11. 室温旋转反应 30 - 60 分钟。
12. 将离心管置于磁力架上, 收集上清液至新的离心管中, 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

### 本产品文章中的写法:

英文: Dowobio (Shanghai, China)

中文: 上海多沃生物科技有限公司 Dowobio, 上海