

## RNA Antisense Purification(RAP) Kit

### RAP 试剂盒说明书

#### KT106-01 系列：不带阳性对照体系

Cat. No. KT106-0101 (12 rxns)

Cat. No. KT106-0102 (24 rxns)

Cat. No. KT106-0103 (48 rxns)

#### KT106-02 系列：包含阳性对照体系

Cat. No. KT106-0201 (12 rxns)

Cat. No. KT106-0202 (24 rxns)

Cat. No. KT106-0203 (48 rxns)

按试剂标签提示分开储存

For research use only, not intended for diagnostic testing.

## 产品简介:

RAP (RNA Antisense Purification) 实验室通过设计生物素标记目标 RNA 互补探针组, 其与链霉亲和素磁珠结合, 将目标 RNA 特异性结合的同时, 特异性捕获 RNA 结合调控的各种 RNA 及 RNA 结合蛋白质 (RBPs)。本产品可用于在捕获大多数动物组织和细胞中 lineRNA 或者 circRNA 结合的蛋白。

## 试剂盒包装组分:

表 1 KT106-01 试剂盒包装组分信息

室温保存试剂				
编号	试剂	数量(12 rxns)	数量(24 rxns)	数量(48 rxns)
SCAP-1	Cell lysis buffer	25mL	50mL	100mL
SCAP-2	Hybridization buffer	25ml	50ml	100ml
SCAP-3	Wash buffer	65ml	130ml	260ml
SCAP-4	PK buffer	1.5ml	3ml	6ml
SCAP-5	elution buffer	1.5ml	3ml	6ml
4℃保存试剂				
SCAP-6	ProteinaseK	150uL	300uL	600uL
SCAP-7	SA-链霉亲和素磁珠	650uL	1.3ml	2.6ml
-20℃保存试剂				
SCAP-8	蛋白酶抑制剂	150uL	300uL	600uL
SCAP-9	PMSF	150uL	300uL	600uL
SCAP-10	RNase inhibitor	120uL	240uL	480uL

表 2 KT106-02 阳性试剂盒包装组分信息

室温保存试剂				
编号	试剂	数量(12 rxns)	数量(24 rxns)	数量(48 rxns)
SCAP-1	Cell lysis buffer	25mL	50mL	100mL
SCAP-2	Hybridization buffer	25ml	50ml	100ml
SCAP-3	Wash buffer	65ml	130ml	260ml
SCAP-4	PK buffer	1.5ml	3ml	6ml
SCAP-5	elution buffer	1.5ml	3ml	6ml
4℃保存试剂				
SCAP-6	ProteinaseK	150uL	300uL	600uL
SCAP-7	SA-链霉亲和素磁珠	650uL	1.3ml	2.6ml
-20℃保存试剂				
SCAP-8	蛋白酶抑制剂	150uL	300uL	600uL
SCAP-9	PMSF	150uL	300uL	600uL
SCAP-10	RNase inhibitor	120uL	240uL	480uL

阳性对照体系：（-20℃保存）				
SCCHR-11	阳性对照探针 TERC (100pmol/ul)	15 uL	30 uL	60 uL
SCCHR-12	阴性对照探针 LacZ (100pmol/ul)	15 uL	30 uL	60 uL
SCCHR-13	阳性对照抗体 TCAB1 (abcam, ab99376)	10 uL, 足够检测 4-5 个 WB	20 uL, 足够检测 8-10 个 WB	40 uL, 足够检测 8-10 个 WB
SCCHR-14	RNA q-pcr 阳性检测引物 TERC (F/R) mix	25 uL (10uM)	50 uL (10uM)	100 uL (10uM)
SCCHR-15	RNA q-pcr 阴性检测引物 GAPDH (F/R) mix	25 uL (10uM)	50 uL (10uM)	100 uL (10uM)

**注：**对照组与实验组消耗试剂量相同，一次 RAP 实验含 Input 组、阳性探针组、阴性探针组，要消耗 2 rxns 试剂量。

### 阴性对照探针（试剂盒包含）

ChIRP 实验阴性对照探针一般是 LacZ 探针，赛诚参考序列如下：

LacZ_P1	CTGAATATCGACGGTTTCCA
LacZ_P2	GCTGTATCGCTGGATCAAAT
LacZ_P3	GTCGTTTTACAACGTCGTGA

### 阳性对照探针（阳性试剂盒包含）

阳性对照体系为端粒 RNA、端粒 DNA 和 TCAB1 蛋白的互动，阳性探针为 TERC-RNA 探针，序列如下：

TERC-P1	GACAAAAAATGGCCACCACC
TERC-P2	CAGCAGCTGACATTTTTTGT
TERC-P3	TGACAGAGCCCAACTCTTCG
TERC-P4	AAGCGAACTGCATGTGTGAG
TERC-P5	CAGGTTTGGGGTTCACAAG

### q-pcr 检测引物：

TERC_Q-PCR_F	agagttgggctctgtcagc
TERC_Q-PCR_R	aggaaagcgaactgcatgt
GAPDH(RNA)-human_F	tccatggcaccgtcaag
GAPDH(RNA)-human_R	cagccttctccatggtgg

### 实验过程摘要:

蛋白在体内与 RNA 结合, 将生物素化的探针与靶 RNA 杂交, 并使用磁性链霉抗生物素蛋白珠纯化染色质复合物, 然后进行严格的洗涤。用 RNase A 和 H 的混合物洗脱了 lncRNA 结合的蛋白质。

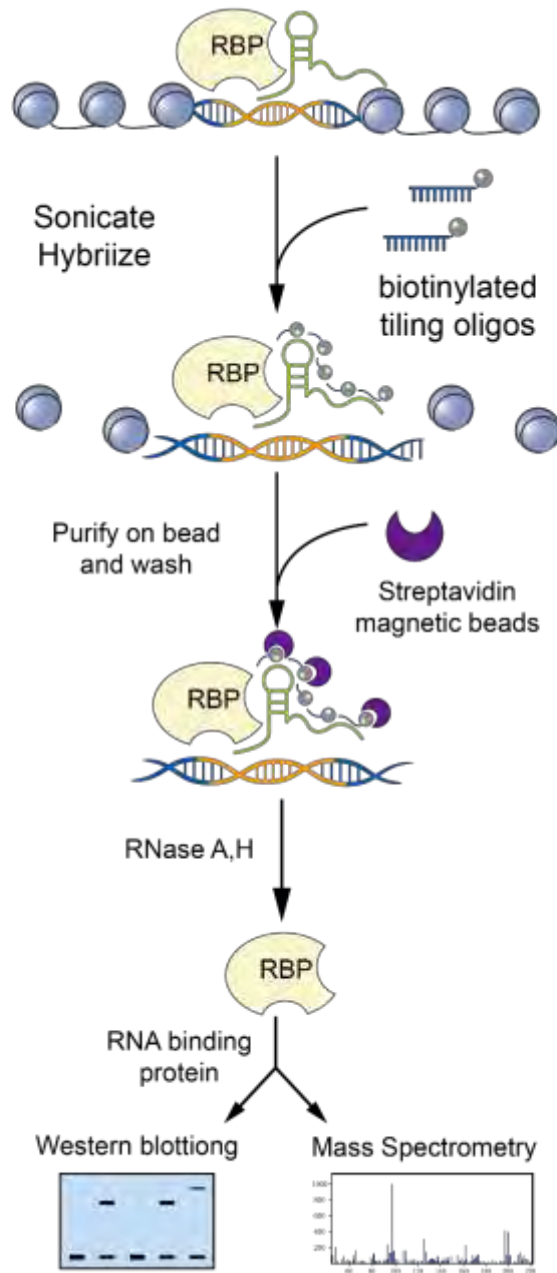


图 1 RAP 试剂盒实验过程示意图

## 实验前准备

### 细胞准备

#### A 动物组织处理:

细胞量: 约  $1-2 \times 10^7$  个

动物组织经过组织匀浆或液氮研磨后, 去除大颗粒组织后用 PBS 重悬细胞, 清洗 2-3 次, 3000rpm 离心 3min, 去除上清后  $-80^{\circ}\text{C}$  保存或继续进行实验。

注: 尽量将上清液彻底吸干再保存。

#### B 动悬浮细胞交联:

细胞量: 约  $1-2 \times 10^7$  个

悬浮细胞培养之后连同培养液收集到离心管中, 3000rpm 离心收集细胞沉淀; 细胞沉淀用 PBS 重悬再离心去上清, 重复清洗细胞 3 次, 去除上清后  $-80^{\circ}\text{C}$  保存或继续进行实验。

注: 尽量将上清液彻底吸干再保存。

#### C 贴壁细胞交联:

细胞量: 约  $1-2 \times 10^7$  个

贴壁细胞培养好后, 用胰酶消化或者细胞刮刮下转移到离心管中, 3000rpm 离心收集细胞沉淀; 细胞沉淀用 PBS 重悬再离心去上清, 重复清洗细胞 3 次, 去除上清后  $-80^{\circ}\text{C}$  保存或继续进行实验。

注: 尽量将上清液彻底吸干再保存。

### 探针准备:

#### A 线性 RNA 探针准备

1. 根据靶标 RNA 序列, 每 100nt 中选择一条段为 20nt 序列, 设计其反向互补的 DNA 序列作为 RAP 探针;
2. 将设计的 DNA 序列分别合成多条带 biotin 标记的探针, 5' 末端或 3' 末端标记均可;
3. 多条探针计算好浓度混合为包含各 100pmol/uL 或 50pmol/uL 的混合探针溶液, 用 NF 水溶解即可, 使用时每 1mL 的细胞裂解液用 100pmol 探针

#### B circRNA 探针准备

1. 根据靶标 RNA 序列, 在环状节点位置选择一条段为 20nt 序列 (节点前后各取 7-13nt), 设计其反向互补的 DNA 序列作为 RAP 探针;

2. 将设计的 DNA 序列分别合成多条带 biotin 标记的探针，5' 末端或 3' 末端标记均可；
3. 将探针溶解 100pmol/uL 或 50pmol/uL 的混合探针溶液，用 NF 水溶解即可，使用时每 1mL 的细胞裂解液用 100pmol 探针  
(赛诚提供探针制备服务，如有需要欢迎咨询)

### 需要的额外材料：

#### 试剂：

RNase H  
RNase A  
Trizol 溶液  
氯仿（三氯甲烷）  
RNA 逆转录试剂  
Q-pcr 试剂  
银染试剂  
WB 试剂

#### 仪器设备：

电泳仪  
磁力架（赛诚有售，如有需要欢迎咨询）  
旋转孵育器  
Q-pcr 仪  
化学发光检测仪

## RAP 实验步骤

注：实验全程环境为 Nuclease-free 环境，全过程须使用无 RNase 污染的实验用具和试剂，操作过程中也要防止 RNase 污染

### A 细胞裂解与染色体超声断裂

1. 向 Cell lysis buffer (SCAP-1) 中加入蛋白酶抑制剂和 RNA 酶抑制剂，每 mL 加入 12uL PMSF (SCAP-9) 和 10uL 蛋白酶抑制剂 (SCAP-8) 和 5uL RNase inhibitor (SCAP-10) ；

2. 在交联的细胞沉淀中加入 1mL 含有蛋白酶抑制剂和 RNA 酶抑制剂的 Lysis Buffer，吹打重悬并涡旋震荡 15s，然后在 4℃ 旋转裂解 1-2h；

注：一次 1mL 的染色体断裂的细胞裂解液可以分为 input, target 组, lacZ 组, 即两个反应的量。

3. 如果细胞裂解液出现粘稠物质可用超声破碎仪处理使粘稠物溶解，然后 1,2000rpm 4℃ 离心 15min 后取上清至新的 EP 管中。

注：出现的粘稠物是细胞核的染色质成分，裂解液粘稠会增加磁珠的非特异性结合，可使用超声使染色质断裂从而增加溶解度，只需超声几秒即可，或者使用 DNA 酶处理使 DNA 降解，减少粘稠。

## B 探针-RNA 免疫沉淀

1. 取上述步骤所得上清液 45μL 至 1.5mL 离心管，储存于-20℃，此为 Input。

2. 取上述步骤所得上清液 450μL 至 1.5mL 或 2mL 的离心管中，加入 2 倍体积（即 0.9mL）的 Hybridization buffer (SCAP-2)，并加入 5μL RNase inhibitor (SCAP-10)，并按每个反应加入 100pmol（约 500~600ng）探针的量加入标记的 DNA 探针，于 37℃ 旋转孵 4h。

Negative control IP: LacZ 探针。

Target-specific IP: 阳性对照探针或者目的探针。

3. 在探针与裂解液孵育将近4h时进行磁珠预处理，即每个IP组取50uL链霉亲和素磁珠 (SCAP-7) 只离心管中，于磁力架上静置直到磁珠完全吸附到管壁上，吸除上清，再用 500uL Lysis Buffer (SCAP-1) 洗磁珠2次，吸除上清备用。

注：磁珠不要冰冻，不要干裂，操作过程中不要剧烈吹打磁珠

4. 探针与裂解液孵育4h后，转移至处理好的磁珠管中，37℃ 旋转孵30min。

5. 轻微离心后置于磁力架上待溶液澄清，弃掉上清液。

6. 加入 1mL Wash Buffer (SCAP-3) 在 37℃ 旋转洗 5min，轻微离心后置于磁力架上待溶液澄清弃掉上清液。

7. 重复清洗 5 次。

8. 清洗好的磁珠每个 IP 组取 1/10-1/5 磁珠于新 EP 管中用于提取 RNA，剩下的用于提取蛋白。Input 组取等量（1/10-1/5）提取 RNA。

注：提取的 RNA 经逆转录后 q-pcr 检测证明 RAP 探针对目标 RNA 的正确结合及有效捕获。

## C RNA、蛋白的洗脱

### RNA洗脱 (1/10-1/5) :

1. 向磁珠中加入50uL PK buffer (SCAP-4) 和5uL Proteinase K (SCAP-6), 于65℃孵育45min, 然后95℃孵育5min使DNA探针与目的RNA分开, 迅速置于冰上, 加入500uL的Trizol溶液涡旋振荡10s, 室温静置10min; input组直接加入500uL Trizol溶液提取RNA。
2. 再加入100 μL 氯仿, 涡旋振荡10s, 在4℃, 12000rpm离心15min后小心吸取上层水相至新的离心管中;

注: 在抽提 RNA 过程中, 要小心吸取上清, 避免吸到下层有机相

3. 加入2.5倍体积无水乙醇混匀 (可选择加入1-2uL糖原帮助沉淀, 糖原可使用碧云天的) 后置于-80℃沉淀过夜。
4. 第二天取出在4℃, 12000rpm离心15min后小心去除上清, 然后用75%乙醇清洗沉淀3次, 最后一次尽量完全去除上清, 开盖晾干3min左右, 用15uLRNase-free H<sub>2</sub>O溶解。

注: 乙醇沉淀 RNA 后要小心移除上清, 防止 RNA 丢失

### RNA q-pcr检测注意事项:

1. 为了保证单一变量, input组、阳性探针组、阴性探针组获得的RNA产物最终用相同体积的水溶解, 并且在逆转录过程中用相同体积RNA进行逆转录, 不要测浓度之后把产物浓度调平。
2. input组一般是取10%的量提取的RNA, q-pcr的到的Ct值是1/10底物的数据, 计算时Ct要减去3.3。

### 3. Q-pcr结果计算示例:

$$\Delta Ct [\text{normalized IP}] = (Ct [\text{IP}] - (Ct [\text{Input}] - \text{Log}_2 (\text{Input Dilution Factor})))$$

$$\% \text{ Input} = 2^{-(\Delta Ct [\text{normalized IP}])} * 100\%$$

我们的 input 通常去总量的 1/10, 即稀释了 10 倍,  $\text{Log}_2 (\text{Input Dilution Factor}) \approx 3.3$

计算示例:

	input	SNP70
U1	14.05	17.55

$$\Delta Ct = 17.55 - (14.05 - 3.3) = 6.8 \quad \% \text{ input} = 2^{-(6.8)} * 100\% = 0.9\%$$

阴性对照组与目的组计算方法一样, 最后比较目的组和阴性对照组的相对捕获量。



### 蛋白的洗脱（剩余的磁珠和 input）：

1. 向磁珠中加入 40uL elution buffer, 100ug/mL RNase A 和 0.1U/uL RNase H, 于 37°C 孵育 30min;

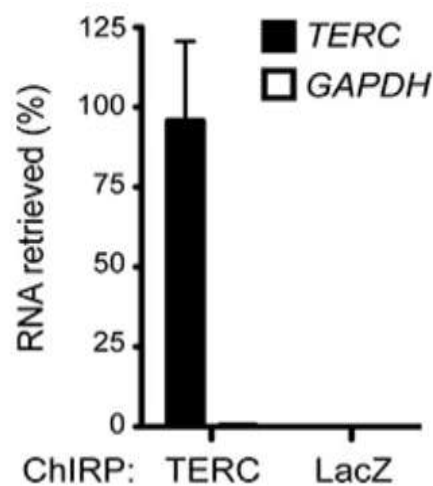
**注：**这里的 RNase A 和 RNase H 是终浓度。

2. 后加入 10uL 5x 蛋白 Loading buffer, 100°C 煮 10min 后离心取上清于新的 EP 管中即为蛋白产物。蛋白产物可用于银染, 质谱或 WB 检测。

### 结果示例：

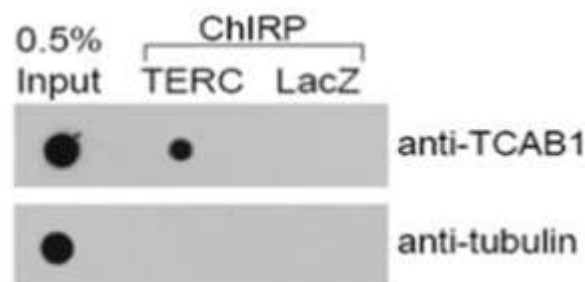
#### 阳性对照体系：

图显示来自 HeLa 细胞的人端粒酶 RNA (TERC) 相对于 GAPDH 的富集, GAPDH 是用作阴性对照的丰富细胞 RNA。



q-pcr 检测 TERC 探针富集目标 RNA 效率

蛋白 TCAB1 是已知的端粒酶 holocomplex 伴侣蛋白, 图表明 TERC RNA 富集 TCAB1 蛋白。

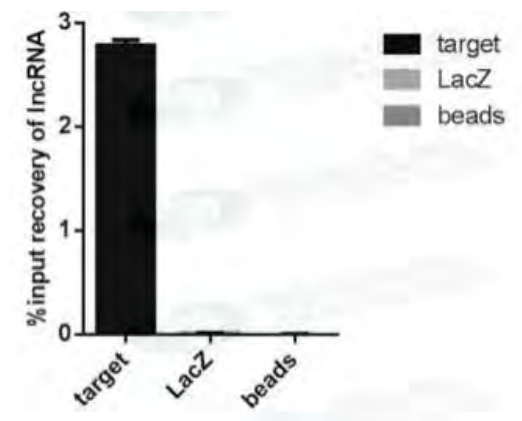


dot blot 检测 TERC 富集的 TCAB1

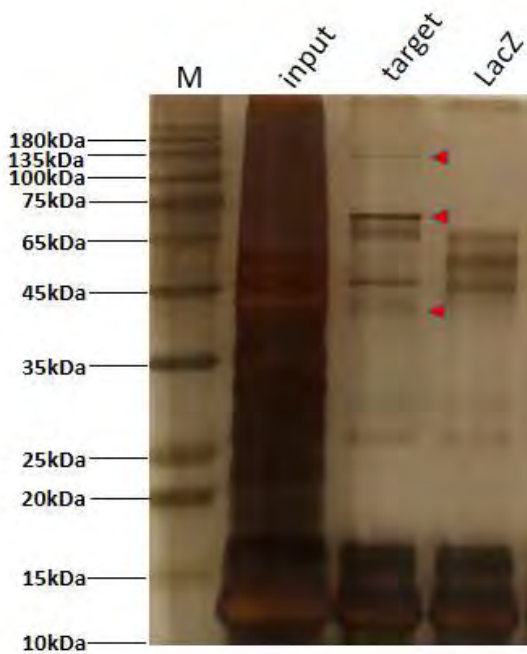
## RAP 实验结果案例：

通过 RAP 实验捕获与 lncRNA-A 结合的蛋白。

检测探针对靶标 RNA 的有效捕获：



RAP 蛋白产物银染结果：



银染可以看到明显的蛋白条带，并且目的探针组相对于其阴性对照探针组有差异条带，后续可以进行质谱分析 lncRNA-A 结合的蛋白，或者进行 WB 检测靶蛋白的结合。