

ChainFree[®] Flag 标签 RIP 试剂盒（动物）

ChainFree[®] DYKDDDDK-Tag (Flag-Tag) RIP Kit

产品信息

货号	产品名称	规格
FI8704-12T	ChainFree [®] DYKDDDDK-Tag (Flag-Tag) RIP Kit	12 次
FI8704-24T	ChainFree [®] DYKDDDDK-Tag (Flag-Tag) RIP Kit	24 次

产品描述

本试剂盒采用 ChainFree[®] Anti-Flag 磁珠来高效完成 Flag 标签（DYKDDDDK）融合蛋白的 RNA 免疫共沉淀（RIP）实验。ChainFree[®] Anti-Flag 磁珠偶联的是经过严格筛选、优化并重组表达的无轻、重链的 Flag 抗体，所以 IP 洗脱液中不会有抗体轻、重链污染。

实验前先将 Flag 标签与目标蛋白在细胞或组织中融合表达。裂解样本后，将 ChainFree[®] Anti-Flag 磁珠加入样本中，磁珠上偶联的 Flag 抗体与 Flag 标签融合蛋白及其结合 RNA 形成复合体，去除未结合的物质后，洗脱并分离蛋白与 RNA，再利用 qPCR 或高通量测序（Seq）方法来鉴定或筛选与目标蛋白结合的 RNA。

试剂盒组分

编号	名称	12T 规格	24T 规格	储存条件
①	ChainFree [®] Anti-Flag 磁珠	250 μ L	500 μ L	4 $^{\circ}$ C, 1 年
②	裂解缓冲液	7 mL	14 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
③	漂洗液	25 mL	50 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
④	洗脱缓冲液	550 μ L	1.1 mL	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑤	蛋白酶抑制剂	190 μ L	380 μ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑥	RNase 抑制剂	50 μ L	100 μ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑦	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 20 μ L 磁珠。由于每次 IP 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. 自备试剂：Flag 抗体（用于 Western-Blot 检测，辉骏产品货号 FI01104）、PBS、RNase-free 水、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 操作步骤

1. 样本裂解

1.1 动物细胞

- (1) 实验组和对照组各取 $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ 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 300~500 μL 预冷的②裂解缓冲液、3~5 μL ⑤蛋白酶抑制剂（按 1%添加）和 1.5~2.5 μL ⑥RNA 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，收集上清至新的无 RNase 离心管中。
- (5) 取 30 μL 作为蛋白 input，取 30 μL 作为 RNA input，剩余用于 RIP 实验，置于冰上备用或 -80°C 保存。

1.2 动物组织

- (1) 采用预冷的 PBS (RNase-free) 清洗新鲜组织 2~3 次，彻底去除血液等成分；如果样本为冷冻组织，在取样时也需要进行清洗操作。
- (2) 实验组和对照组各取 0.1~0.2 g 干净组织，用液氮在研钵中充分研磨，转移粉末至预冷的、新的无 RNase 离心管中。
- (3) 将样本置于冰上，每组加入 300~500 μL 预冷的②裂解缓冲液、3~5 μL ⑤蛋白酶抑制剂（按 1%添加）和 1.5~2.5 μL ⑥RNA 酶抑制剂（按 0.5%添加），吹打混匀。
- (4) 冰上超声破碎至溶液基本澄清。
- (5) 4°C 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的无 RNase 离心管中。
- (6) 取 30 μL 作为蛋白 input，取 30 μL 作为 RNA input，剩余用于 RIP 实验，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。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. 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⑦10 mL 离心管，加入实验组和对照组总共所需的 3.8 mL ③漂洗液、19 μ L ⑤蛋白酶抑制剂（按照 0.5%添加）和 2 μ L ⑥ 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。

3. RNA 免疫共沉淀（RIP）

- (1) 将①ChainFree[®] Anti-Flag 磁珠上下颠倒混匀，每组取 20 μ L 磁珠到新的无 RNase 离心管中。
- (2) 每组加入 200 μ L 漂洗液（步骤 2 准备），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) 向磁珠中加入相应组别的样本裂解液（步骤 1 制备），放混匀仪上室温孵育 1 h 或 4 $^{\circ}$ C 孵育 4 h。
- (5) 放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (6) 每组加入 500 μ L 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (7) 重复上步操作一次。
- (8) 再次加入 500 μ L 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，取 100 μ L 移入新离心管中用于蛋白检测（标注为管 1），剩余 400 μ L 用于 RNA 提取（标注为管 2），两管分别放磁力架上静置 1 min 并弃上清，保留磁珠。

4. 诱饵蛋白检测

- (1) 向管 1 的磁珠中加入 20 μ L 1 \times SDS-PAGE 上样缓冲液，95 $^{\circ}$ C 加热 3 min。
- (2) 放磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中，用于诱饵蛋白的 Western Blot 检测。

5. RNA 提取纯化

按照以下步骤或购买微量 RNA 提取试剂盒来提取 RNA，提取后的 RNA 可用于 qPCR 实验或高通量测序：

- (1) **方案 1：**向管 2 的磁珠中加入 40 μ L ④洗脱缓冲液，涡旋震荡 20s，混匀仪上室温洗脱 10~15 min；涡旋震荡 20s，1000 g 离心 20 s，放磁力架上静置 1 min，收集上清新的无 RNase 离心管中；向上清液中加入 1 mL Trizol，室温静置 5 min，4 $^{\circ}$ C 12000 g 离心 10 min，取上清。

方案 2：向管 2 的磁珠中加入 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，涡旋混匀或猛烈晃动 15 s，室温放置 2~3 min。
- (3) 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 沉淀过夜。
- (5) 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 保存或直接进行反转录。

* **注意：**i. 选择方案 1（先洗脱再提取 RNA），可能损失部分 RNA；如果 RNA 含量低，建议选择方案 2（从磁珠上直接提取 RNA），提取效率更高，但可能会增加非特异性。

- ii. RIP 后的 RNA 一般较微量，操作时注意勿把 RNA 沉淀吸走。
- iii. 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。

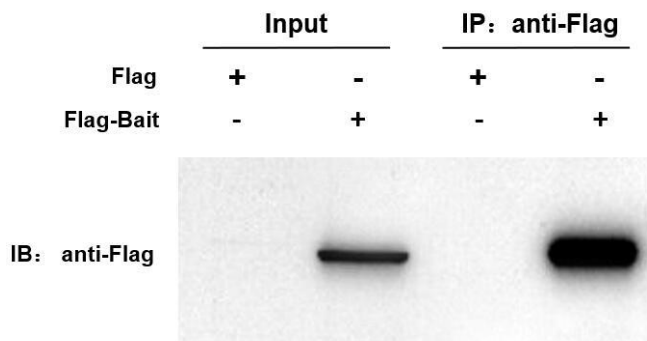
问题解决

问题	可能原因	解决方案
获得的诱饵蛋白量低	样品中的目标蛋白量不够	提高样本用量或改善裂解方法
获得的 RNA 含量少	样本量不够	提高样本用量或采用 2 倍体系进行实验
	RNA 提取不好	更换 RNA 提取方法或者 RNA 提取试剂盒

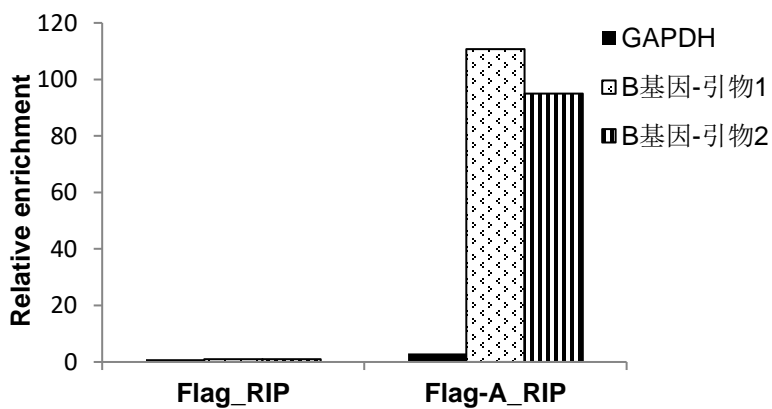
使用案例

实验目标：检测诱饵蛋白（Flag-A）与待测基因（B）是否结合。

- (1) 实验组：表达 Flag-诱饵蛋白的样本采用 ChainFree[®] Anti-Flag 磁珠进行 RIP 实验；
- (2) 对照组：表达 Flag 空载体的样本采用 ChainFree[®] Anti-Flag 磁珠进行 RIP 实验。



诱饵蛋白的 western-blot 检测图



Anti-Flag RIP-qPCR 结果统计图