

货号	名称	规格	存储
F1508-12T	ChainFree mCherry-Tag RIP 试剂盒 (动物)	12T	-20℃
F1508-24T	ChainFree mCherry-Tag RIP 试剂盒 (动物)	24T	-20℃

### 产品简介

本试剂盒采用 ChainFree® Anti-mCherry 纳米抗体磁珠来完成 mCherry 标签融合蛋白的免疫共沉淀实验。ChainFree® Anti-mCherry 磁珠偶联的是经过严格筛选、优化并重组表达的 mCherry 纳米抗体，所以 IP 洗脱液中不会有抗体轻、重链污染。

实验前先将 mCherry 标签与目标蛋白在样本中融合表达。裂解样本后，加入 ChainFree® Anti-mCherry 磁珠，磁珠上偶联的 mCherry 纳米抗体与样本中的 mCherry 标签融合蛋白及其结合蛋白形成复合体，去除未结合的物质后，洗脱并分离蛋白与RNA，再通过 qPCR 或高通量测序 (Seq) 来鉴定或筛选与目标蛋白结合的RNA。

### 试剂盒成分

编号	名称	12T 规格	24T 规格	储存条件
①	ChainFree® Anti-mCherry 磁珠	250 μL	500 μL	4℃, 1年
②	裂解缓冲液	7mL	14mL	4℃, 1年
③	漂洗液	25mL	50mL	4℃, 1年
④	洗脱缓冲液	550 μL	1.1mL	-20℃, 1年
⑤	蛋白酶抑制剂	190 μL	380 μL	-20℃, 1年
⑥	RNase 抑制剂	50 μL	100 μL	-20℃, 1年
⑦	中和液	55 μL	110 μL	4℃, 1年
⑧	10mL 离心管	1 个	1 个	——

**\*注意：**该试剂盒包含足够完成 12、24 个反应的试剂，每个反应使用 20 μL 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：mCherry 抗体、PBS、RNase-free 水、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、冷冻或剧烈涡旋磁珠，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. 实验的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 操作方法

##### 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℃ 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 5s；

(4) 4℃ 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的无 RNase 离心管中；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℃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 μL⑤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℃ 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℃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 μg/μL，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⑧10 mL 离心管，加入实验组和对照组总共所需的 3.8 mL③漂洗液、19 μL ⑤蛋白酶抑制剂（按 0.5%添加）和 2 μL 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-mCherry 磁珠上下颠倒混匀，每组取 20 μL 磁珠到新的无 RNase 离心管中。

(2) 每组加入 200μL 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1min 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℃孵育 4 h。

(5) 放磁力架上静置 1 min 并弃上清。

(6) 每组加入 500 μL 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 μL 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，取 100 μL 移入新离心管中用于蛋白检测（标注为管 1），剩余 400 μL 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 μL 1×SDS-PAGE 上样缓冲液，95℃加热 3 min。

(2) 放磁力架上静置 1min，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：

**方案 1：**向管 2 的磁珠中加入 40 μL④洗脱缓冲液，涡旋震荡 20s，放混匀仪上室温洗脱 10~15 min，涡旋震荡 20s，1000g 离心 20s，放磁力架上静置 1 min，收集上清至新的无 RNase 离心管中；加入 4 μL ⑦中和液，再加入 1 mL Trizol，室温静置 5 min，4℃ 12000g 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℃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℃12000g 离心 15min，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℃ 沉淀过夜。

(5) 4℃12000g 离心 10 min，管底可见 RNA 沉淀，弃上清。

(6) 加入 1mL 75%乙醇 (DEPC 水或 RNase-free 水配制)。

(7) 4℃ 12000g 离心 10min, 弃上清; 5000g 快速离心 1 s, 小心吸尽液体。

(8) 待 RNA 略干后, 加入 20 μL DEPC 水或 RNase-free 水或溶解, - 80℃ 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 (从树脂上直接提取 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

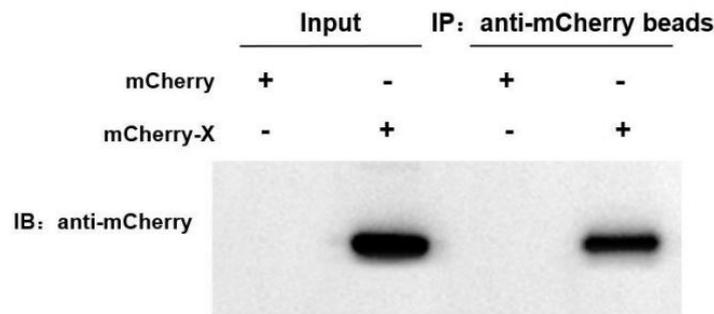
问题	可能原因	解决方案
获得的诱饵蛋白量低	样本中的目标蛋白量不够	提高样本用量
获得的 RNA 含量少	样本量不够	提高样本用量或采用 2 倍体系进行实验
	RNA 提取不好	更换 RNA 提取方法或者 RNA 提取试剂盒

#### 使用案例

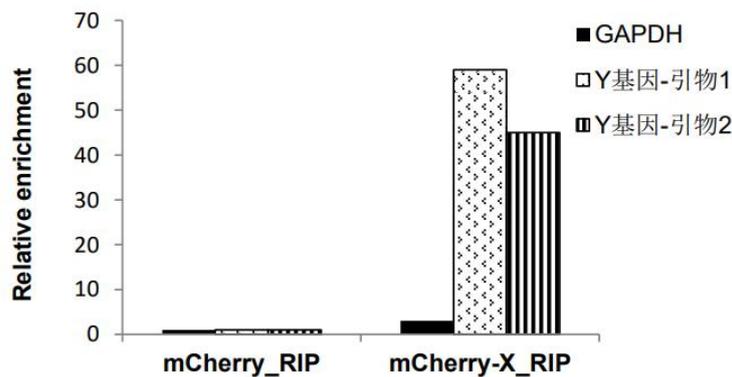
实验目标: 检测诱饵蛋白 (mCherry-X) 与待测基因 (B) 是否结合。

(1) 实验组: 表达 mCherry-X 的样本采用 ChainFree® Anti-mCherry 磁珠进行 RIP 实验;

(2) 对照组: 表达 mCherry 空载体的样本采用 ChainFree® Anti-mCherry 磁珠进行 RIP 实验。



诱饵蛋白的 western-blot 检测图



RIP-qPCR 结果统计图