

货号	名称	规格	存储
F1504-12T	Flag-Tag RIP 试剂盒（动物）	12T	-20℃
F1504-24T	Flag-Tag RIP 试剂盒（动物）	24T	-20℃

产品简介

本试剂盒采用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。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 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。

试剂盒成分

编号	名称	12T 规格	24T 规格	储存条件
①	Anti-Flag 磁珠	250 μ L	500 μ L	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 μ L	1.1mL	-20℃，1 年
⑤	蛋白酶抑制剂	190 μ L	380 μ L	-20℃，1 年
⑥	RNase 抑制剂	50 μ L	100 μ L	-20℃，1 年
⑦	10mL 离心管	1 个	1 个	——

***注意：**该试剂盒包含足够完成 12、24 或 40 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

- 自备试剂：Flag 抗体、PBS、RNase-free 水、Trizol、氯仿、异丙醇、75%乙醇。
- 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

- 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。
- 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。
- 请务必使用无 RNase 的实验材料：如离心管、枪头等。
- 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。
- 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

- 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；
- 将样本置于冰上，每组加入 300~500 μ L 预冷的②裂解缓冲液、3~5 μ L ⑤蛋白酶抑制剂（按 1%添加）和 1.5~2.5 μ L ⑥RNA 酶抑制剂（按 0.5%添加），吹打混匀；
- 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。

iii. 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 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①Anti-Flag 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 200 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。

(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 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:

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 5 min, 放磁力架上静置 1 min, 收集上清至新的无 RNase 离心管中; 向上清液中加入 1 mL Trizol, 室温静置 5 min, 4℃ 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 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℃ 沉淀过夜。

(5) 4℃12000g 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℃ 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

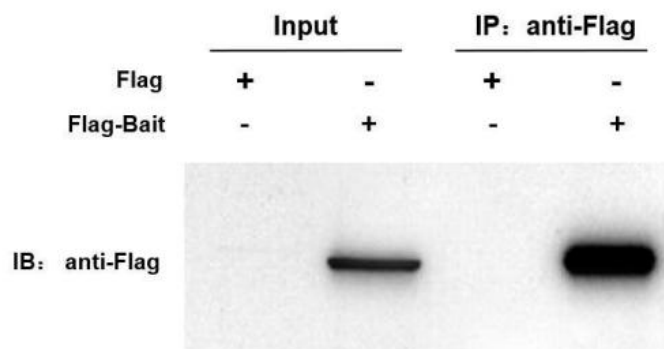
问题	可能原因	解决方案
获得的复合产物少	样本量不够	提高样本用量
	孵育时间不够	延长孵育时间 (如孵育过夜), 但需要注意孵育时间过长也可能导致非特异性结合增多
	RNA 探针量不够	提高 RNA 探针用量
SDS-PAGE 检测有很多非特异结合的条带	非特异性的蛋白结合在磁珠上	增加漂洗时间和次数, 或样本预处理: 先与磁珠孵育, 去除非特异结合蛋白

使用案例

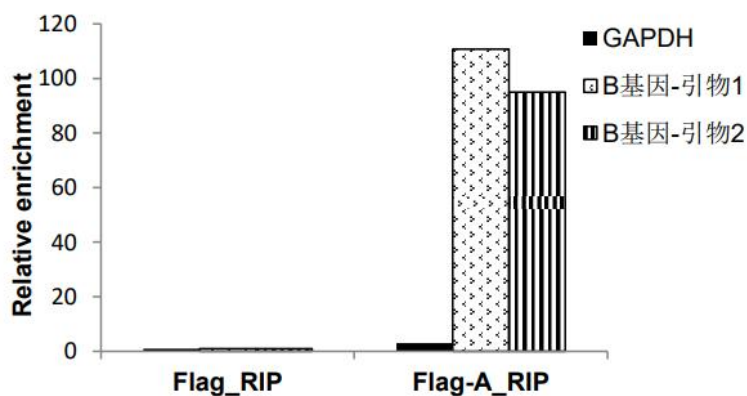
实验目标: 检测诱饵蛋白 (Flag-A) 与待测基因 (B) 是否结合。

(1) 实验组: 表达 Flag-诱饵蛋白的样本采用 Anti-Flag 磁珠进行 RIP 实验;

(2) 对照组: 表达 Flag 空载体的样本采用 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