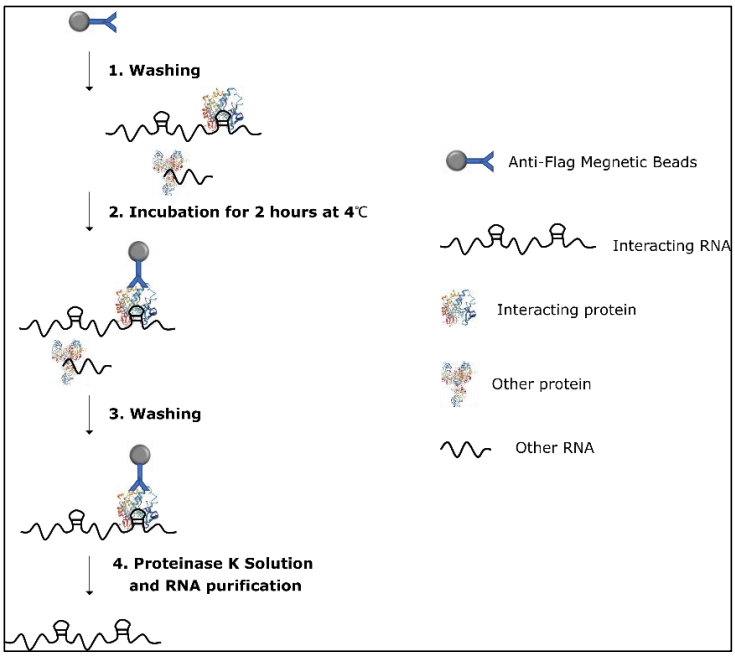
# Waals™ Flag-Tag Protein-RNA Enrichment Kit

## 操作说明

- **描　述：**Waals™ Flag-Tag Protein-RNA Enrichment Kit，包含 Anti-Flag Magnetic Beads, Waals™ RNA IP Lysis Buffer, RNA IP Buffer, RNase Inhibitor, 0.1 M DTT, 0.5 M EDTA, DNase I, Proteinase K, 10% SDS, Solution I, Solution II, Solution III, Nuclease-Free Water。
- **自备试剂：**蛋白酶抑制剂、酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)、无水乙醇
- **试剂盒储存：**Waals™ Flag-Tag Protein-RNA Enrichment Kit (Part I)，4℃储存（**勿冷冻**）；Waals™ Flag-Tag Protein-RNA Enrichment Kit (Part II)，-20℃储存。
- **介　绍**

细胞中存在大量蛋白与 RNA 的复合物，它们的相互作用发挥重要的生物学功能。Waals™ Flag-Tag Protein-RNA Enrichment Kit 提供 Anti-Flag 磁珠，可稳定结合带有 Flag 标签的融合蛋白，进而高效富集融合蛋白及其复合物中的 RNA；通过 RNA 纯化可用于后续研究，如 qRT-PCR、RNA-sequencing 等。

## 操作流程




RNA IP 实验流程图

## 操作步骤

■ 细胞裂解及注意事项

1. 用标准的 RNA IP 裂解 buffer (e.g., Waals™ RNA IP Lysis Buffer)并加入蛋白酶抑制剂处理细胞。
2. 至少需要 1 × $10^7$ 个细胞用于 RNA IP 实验。如被检测的 RNA 含量较低则需要更多的细胞。
3. 确保样品是新鲜的且无细菌等污染。
4. 制备好的样品(Cell Lysates)置于-80℃保存。



■ **磁珠准备**

1. 重悬 Anti-Flag 磁珠，吸取 50 μL 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. 将离心管从磁力架上取出，加入 100 μL RNA IP Buffer，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. 将离心管从磁力架上取出，加入 500 μL RNA IP Buffer (4℃预冷)，重悬磁珠。

■ **RNA IP**

1. 用 Waals™ Flag-Tag Protein-RNA Enrichment Kit 提供的试剂按照下表配制 **RNA IP Mix**：

| 试剂名称 | 体积 (μL) | 终浓度 |
|---|---|---|
| RNA IP Buffer | 300 | - |
| 0.1 M DTT | 10 | 1 μM |
| RNase Inhibitor | 2.5 | 100 U |
| 0.5 M EDTA | 30 | 15 μM |
| Cell Lysates | 500 μg | - |
| Use RNA IP Buffer up to | 1 mL | |

2. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
3. 将离心管从磁力架上取出，加入 1 mL **RNA IP Mix**，重悬磁珠。
4. 4℃或室温**旋转**反应 2 小时。

5. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
6. 将离心管从磁力架上取出，加入 500 μL RNA IP Buffer (4℃预冷)，温和混匀。
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 7，3 次。
9. 将离心管从磁力架上取出，加入 500 μL RNA IP Buffer (4℃预冷)，温和混匀。
10. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠。【注】可将上清液转移至新的无菌无酶离心管中，用于后续分析。



11. 将离心管从磁力架上取出，加入 100 μL RNA IP Buffer (4℃预冷)于磁珠离心管，再加入 5 μL DNase I (2 U/μL)，温和混匀。
12. 37℃反应 10 分钟。
13. 将离心管从磁力架上取出，加入 500 μL RNA IP Buffer，重悬磁珠。
14. 用 Waals™ Flag-Tag Protein-RNA Enrichment Kit 提供的试剂按照下表配制 **Proteinase Mix**：

| 试剂名称 | 体积 (μL) |
|---|---|
| RNA IP Buffer | 120 |
| Proteinase K | 5 |
| 10% SDS | 15 |
| | 150 μL |

15. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
16. 将离心管从磁力架上取出，加入 150 μL **Proteinase Mix**，重悬磁珠。
17. 55℃**旋转**反应 20 分钟，或**在非旋转情况下**每 5 分钟温和重悬磁珠 1 次。
18. 将离心管置于磁力架上，收集上清液于新的无菌无酶水离心管，并加入 250 μL RNA IP Buffer。

■ **RNA Isolation**

1. 加入 400 μL 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)至每管。
2. 涡旋 15 秒，室温 14,000 rmp 离心 10 分钟。
3. 取 350 μL 上清液至新的无菌无酶离心管，并加入 400 μL 氯仿。
4. 涡旋 15 秒，室温 14000 rmp 离心 10 分钟。
5. 取 300 μL 上清液至新的无菌无酶离心管。

6. 分别在每管中加入 50 μL Solution I，15 μL Solution II，5 μL Solution III，以及 850 μL 预冷的无水乙醇。
7. 颠倒混匀，置于-20℃或-80℃至少 1 小时或过夜，以沉淀 RNA。
8. 将离心管 14,000 rpm，4℃离心 30 分钟，弃掉上清液。
9. 加入 80%无水乙醇，14,000 rpm，4℃离心 15 分钟，弃掉上清液，空气干燥。
10. 用 15 - 25 μL Nuclease-Free Water 溶解 RNA 沉淀，置于冰上，或-80℃保存。