

货号	名称	规格	存储
F1509-12T	Protein A/G RIP 试剂盒(动物)	12T	-20℃
F1509-24T	Protein A/G RIP 试剂盒(动物)	24T	-20℃
F1509-40T	Protein A/G RIP 试剂盒(动物)	40T	-20℃

### 产品简介

RNA 免疫共沉淀 (RIP) 是研究体内 RNA 与蛋白结合的技术。裂解样本后，采用特异性抗体捕获样本中的诱饵蛋白及其结合 RNA，protein A/G 磁珠沉淀复合物，去除未结合的物质后，洗脱诱饵蛋白和提取结合的 RNA。该 RNA 可用于后续的定量 PCR 检测 (qPCR) 或高通量测序 (seq)。

### 试剂盒成分

编号	名称	12T 规格	24T 规格	40T 规格	储存条件
①	Protein A/G 磁珠	500 μL	1 mL	1.7 mL	4°C, 1 年
②	裂解缓冲液	7mL	14mL	24 mL	4°C, 1 年
③	漂洗液	25mL	50mL	84mL	4°C, 1 年
④	洗脱缓冲液	550 μL	1.1mL	1.8mL	4°C, 1 年
⑤	蛋白酶抑制剂	190 μL	380 μL	640 μL	-20°C, 1 年
⑥	RNase 抑制剂	50 μL	100 μL	170 μL	-20°C, 1 年
⑦	10mL 离心管	1 个	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 μL 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

1. 自备材料：诱饵蛋白 IP 级别抗体（最好是 RIP 或 ChIP 级别抗体）、Normal IgG、PBS、RNase-free 水、微量 RNA 提取试剂盒或提取 RNA 所需的材料【Trizol、氯仿、异丙醇、75%乙醇】。
2. 所需仪器：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°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 0.6~1mL 预冷的②裂解缓冲液、6~10 μL ⑤蛋白酶抑制剂（按 1%添加）和 3~5 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；如果无超声条件，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 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 0.6~1mL 预冷的②裂解缓冲液、6~10 μL⑤蛋白酶抑制剂 (按 1%添加) 和 3~5 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) 向样本裂解液 (步骤 1 制备) 中加入诱饵蛋白抗体 (按照抗体说明书添加) 或 Normal IgG, 放混匀仪上室温孵育 1~2 h 或 4℃过夜。

(2) 将①Protein A/G 磁珠上下颠倒混匀, 每组取 40 μL 磁珠到新的无 RNase 离心管中。

(3) 每组加入 200 μL 漂洗液 (步骤 2 准备), 颠倒混匀 30 次, 500 g 离心 5 min, 弃上清。

(4) 重复上步操作一次。

(5) 向磁珠中加入步骤 (1) 的样本&抗体混合物, 放混匀仪上室温孵育 1h 或 4℃孵育 2 h。

(6) 放磁力架上静置 1 min 并弃上清。

(7) 每组加入 500 μL 漂洗液 (步骤 2 准备), 颠倒混匀 30 次, 4℃ 500g 离心 5 min, 弃上清。

(8) 重复上步操作一次。

(9) 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 4 ℃ 500g 离心 5 min, 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, 4℃ 12000g 离心 5min, 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。

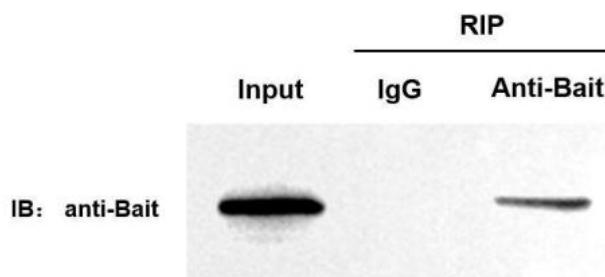
**方案 2:** 向管 2 的磁珠中加入 1 mL Trizol, 室温静置 5 min, 4℃12000 g 离心 10 min, 取上清。

- (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 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。

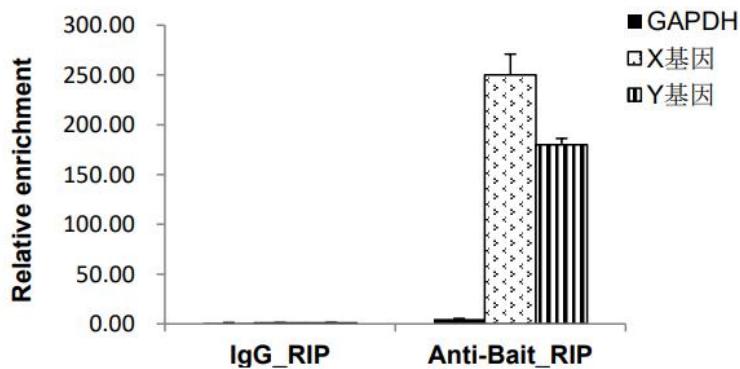
### 使用案例

实验目标: 检测诱饵蛋白和待测基因 (X 和 Y) 的结合 (以内参基因 GAPDH 作为 qPCR 对照)。

- (1) input: 样本裂解液;
- (2) IgG: normal IgG 的 RIP 产物 (对照组);
- (3) Anti-Bait: 诱饵蛋白抗体的 RIP 产物 (实验组)。



诱饵蛋白的 western-blot 检测图



RIP-qPCR 结果统计图