

货号	名称	规格	存储
F1503-12T	Protein G RIP 试剂盒 (动物)	12T	-20℃
F1503-24T	Protein G RIP 试剂盒 (动物)	24T	-20℃
F1503-40T	Protein 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 G树脂沉淀复合物, 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 G 树脂	500 $\mu$ L	1 mL	1.7 mL	4℃, 1 年
②	裂解缓冲液	7mL	14mL	22 mL	4℃, 1 年
③	漂洗液	25mL	50mL	84mL	4℃, 1 年
④	洗脱缓冲液	550 $\mu$ L	1.1mL	1.8mL	4℃, 1 年
⑤	蛋白酶抑制剂	190 $\mu$ L	280 $\mu$ L	640 $\mu$ L	-20℃, 1 年
⑥	RNase 抑制剂	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	170 $\mu$ L	-20℃, 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  $\mu$ 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

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、冷冻或剧烈涡旋树脂, 这些操作可能会引起树脂聚团, 降低结合活性。
2. 为保证树脂均匀分布, 请在使用前通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀树脂。
3. 请在吸取树脂前, 将移液枪枪头尖部剪掉 1~2mm。
4. **请务必使用无 RNase 的实验材料: 如离心管、枪头等。**
5. 树脂的离心步骤需在低速条件下操作, 离心速度大于 5000 $\times$ g 可能会导致树脂聚集和再悬浮困难。
6. 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。
7. 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 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；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 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 G 树脂上下颠倒混匀，每组取 40 μL 树脂到新的无 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) 向树脂中加入步骤（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) 4℃ 500 g 离心 5 min，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，保留树脂。

## 4. 诱饵蛋白检测

- (1) 向管 1 的树脂中加入 20 μL 1×SDS-PAGE 上样缓冲液，95℃加热 3 min。
- (2) 12000g 离心 30s，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 的树脂中加入 40  $\mu$ L④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 $^{\circ}$ C 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  $^{\circ}$ C 12000g 离心 10 min，取上清。

**方案 2:** 向管 2 的树脂中加入 1 mL Trizol，室温静置 5 min，4 $^{\circ}$ C12000 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 $^{\circ}$ C12000g 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 $^{\circ}$ C 沉淀过夜。

(5) 4  $^{\circ}$ C12000g 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 $^{\circ}$ C 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  $\mu$ 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。

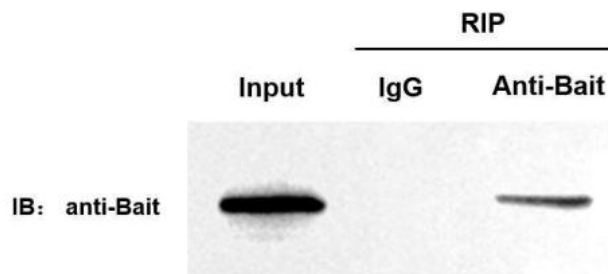
### 使用案例

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）。

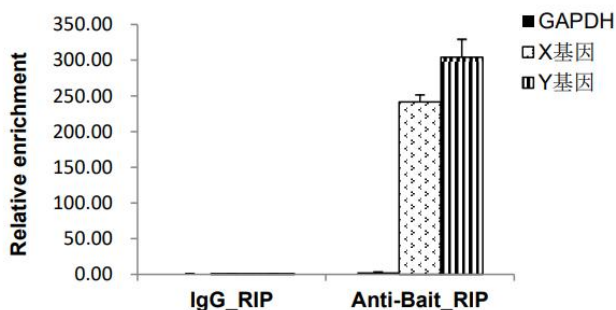
(1) input：样本裂解液；

(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