

Flag标签琼脂糖微珠法RIP试剂盒(动物)

Flag-tag Agrose Beads RNA Immunoprecipitation (RIP) Kit for Mammal

注:本产品干冰运输;试剂按说明书分别保存于4℃及-20℃,保质期12个月。

序号	试剂	货号及规格		储存
		IRR020 (12T)	IRR020M (24T)	
01	Anti-Flag琼脂糖微珠	0.5 mL	1 mL	4℃
02	裂解缓冲液	7 mL	14 mL	4℃
03	漂洗液	25 mL	50 mL	4℃
04	洗脱缓冲液	0.55 mL	1.1 mL	-20℃
05	蛋白酶抑制剂	0.19 mL	0.38 mL	-20℃
06	RNase 抑制剂	50μL	100μL	-20℃

产品简介/Product Description

RNA Immunoprecipitation (RIP) 是研究细胞内 RNA 与蛋白结合情况的技术,是了解转录后调控网络动态过程的有力工具。

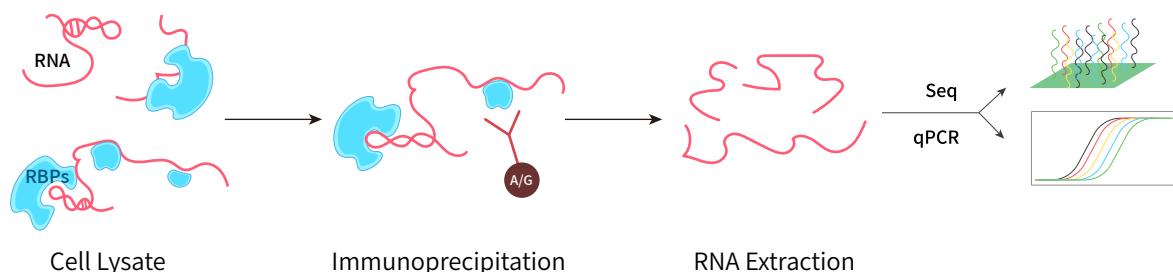
RIP 运用针对目标蛋白的抗体沉淀相应的 RNA- 蛋白复合物,经过逆转录或构建 cDNA 文库,最后结合利用基因特异性分析技术 (PCR、qRT-PCR) 或高通量分析技术 (高通量测序、基因芯片),分析对结合在复合物上的 RNA 类型及多少。

RIP 可应用于的研究领域包括:

- ①蛋白质与 RNA 互作研究;
- ②miRNA 靶基因分析;
- ③增强子 RNA(eRNA) 转录调控分析;

技术路线/Technology mapping

1. 原理流程图



使用流程/Procedure

1. 样品前处理

- ①组织：100~200 mg 组织用冷 PBS（RNase-free）清洗干净，彻底去除血液等成分，液氮充分研磨；
细胞样本： $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ 个细胞用冷 PBS 漂洗 2~3 次，彻底去除培养基成分，4° C 500 g 离心 5 min 收集沉淀。
- ②样本加入 300~500 μ L 预冷的裂解缓冲液、3~5 μ L 蛋白酶抑制剂（按 1:100 添加）和 1.5~2.5 μ L RNA 酶抑制剂（按 1:200 添加），吹打混匀。
- ③细胞：置于冰上裂解 30 min（间隔手动混匀）；为了更充分裂解，也可以冰上超声至溶液基本澄清；组织：最好冰上超声破碎至溶液基本澄清，也可以置于冰上裂解 30 min（间隔手动混匀）。
- ④4° C 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的离心管中；取 30 μ L 作为 input，剩余用于 RNA pull-down 实验，-80° C 保存。

注意：

1. 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。
2. 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

取 10 mL 离心管，加入实验组和对照组总共所需的 3.8 mL 漂洗液、19 μ L 蛋白酶抑制剂（按 0.5% 添加）和 2 μ L 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 Anti-Flag 琼脂糖微珠上下颠倒混匀，每组取 40 μ L 琼脂糖微珠到新的无 RNase 离心管中。
- ②每组加入 200 μ L 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，500 g 离心 5 min，弃上清。
- ③重复上步操作一次。
- ④向琼脂糖微珠中加入步骤的样本 - 抗体混合物，放混匀仪上室温孵育 1h 或 4° C 孵育 2 h。
- ⑤4° C 500 g 离心 5 min，弃上清。
- ⑥每组加入 500 μ L 漂洗液，颠倒混匀 30 次，4° C 500g 离心 5 min，弃上清。
- ⑦重复上步操作一次。
- ⑧再次加入 500 μ L 漂洗液，颠倒混匀 30 次；取 100 μ L 移入新离心管中用于蛋白检测，剩余 400 μ L（标注为管 2）用于 RNA 提取，两管分别 4° C 500g 离心 5 min，弃上清，保留琼脂糖微珠。

4. 诱饵蛋白检测

- ①向管 1 的琼脂糖微珠中加入 20 μ L 1 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液, 95 $^{\circ}$ C加热 3 min。
- ②12000g 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 的琼脂糖微珠中加入 40 μ L 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 的琼脂糖微珠中加入 1 mL Trizol, 室温静置 5 min, 4 $^{\circ}$ C12000 g 离心 10 min, 取上清。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。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)。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。4 $^{\circ}$ C12000g 离心 10 min, 管底可见 RNA 沉淀, 弃上清。加入 1mL 75% 乙醇 (DEPC 水或 RNase-free 水配制)。4 $^{\circ}$ C 12000g 离心 10min, 弃上清, 5000g 快速离心 1 s, 小心吸尽液体。待 RNA 略干后, 加入 20 μ 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:

1. 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 (从琼脂糖微珠上直接提取 RNA), 提取效率更高, 但可能会增加非特异性。
2. RIP 后的 RNA 一般较微量, 操作时注意勿把 RNA 沉淀吸走。
3. 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。

注意事项/Notes

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内;
2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

