

RIP试剂盒 (Protein A/G磁珠) (动物)

RNA Immunoprecipitation (RIP) with Magnetic Protein A/G Beads Kit for Mammal

注:本产品干冰运输;试剂按说明书分别保存于4°C及-20°C,保质期12个月。

序号	试剂	货号及规格			储存
		IRR014 (6T)	IRR014M (12T)	IRR014L (40T)	
01	Protein A/G 磁珠	0.25mL	0.5mL	1 mL	4°C
02	裂解缓冲液	3.5 mL	7mL	14 mL	4°C
03	漂洗液	12.5 mL	25 mL	50 mL	4°C
04	洗脱缓冲液	0.28 mL	0.55 mL	1.1 mL	-20°C
05	蛋白酶抑制剂	0.1 mL	0.19 mL	0.38 mL	-20°C
06	RNase 抑制剂	25 μ L	50 μ L	100 μ L	-20°C

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。

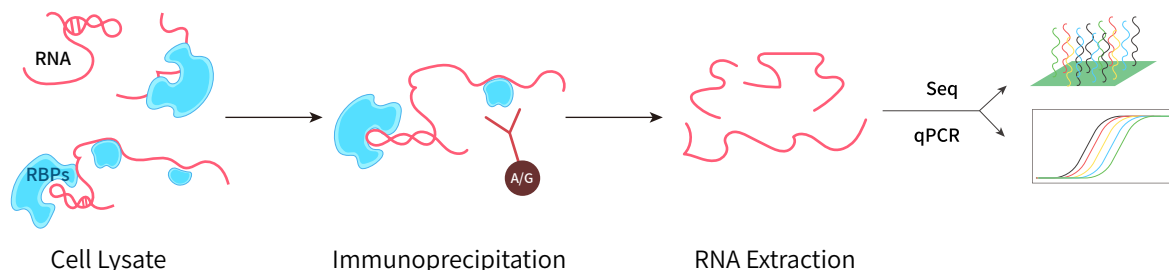
RIP 运用针对目标蛋白的抗体沉淀相应的 RNA- 蛋白复合物, 经过逆转录或构建 cDNA 文库, 最后结合利用基因特异性分析技术 (PCR、qRT-PCR) 或高通量分析技术 (高通量测序、基因芯片), 分析对结合在复合物上的 RNA 类型及多少。

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. 细胞 / 组织样品前处理

- 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 μL 预冷的裂解缓冲液、3~5 μL 蛋白酶抑制剂 (按 1:100 添加) 和 1.5~2.5 μL 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)。
- ④ 4°C 12000 g 离心 15 min, 收集上清至新的离心管中; 取 30 μL 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 μL 蛋白酶抑制剂 (按 0.5% 添加) 和 2 μL 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°C 过夜。
- ②将 Protein 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。
- ⑥ 4°C 500 g 离心 5 min, 弃上清。
- ⑦每组加入 500 μL 漂洗液, 颠倒混匀 30 次, 4°C 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, 颠倒混匀 30 次; 取 100 μL 移入新离心管中用于蛋白检测, 剩余 400 μL (标注为管 2) 用于 RNA 提取, 两管分别用磁力架吸附磁珠, 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 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 的磁珠中加入 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，用磁力架收集上清至新的无 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 的磁珠中加入 1 mL Trizol，室温静置 5 min，用磁力架取上清。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 $^{\circ}$ C 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）。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 $^{\circ}$ C 12000g 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（从磁珠上直接提取 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。

