

# RIP试剂盒(Protein A/G琼脂糖微珠法)(动物)

RNA Immunoprecipitation (RIP) with Protein A/G Agrose 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
		IRR012 (6T)	IRR012M (12T)	IRR012L (40T)	
01	Protein A/G琼脂糖微珠	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 μL	50μL	100μL	-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。

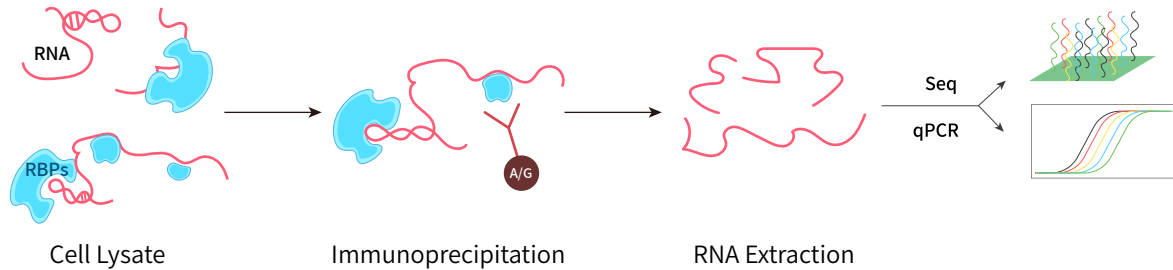
RIP 运用针对目标蛋白的抗体沉淀相应的 RNA- 蛋白复合物, 经过逆转录或构建 cDNA 文库, 最后结合利用基因特异性分析技术 (PCR、qRT-PCR) 或高通量分析技术 (高通量测序、基因芯片), 分析对结合在复合物上的 RNA 类型及多少。

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,  $4^\circ\text{C}$  500 g 离心 5 min 收集沉淀。
- ②样本加入 300~500  $\mu\text{L}$  预冷的裂解缓冲液、3~5  $\mu\text{L}$  蛋白酶抑制剂 (按 1:100 添加) 和 1.5~2.5  $\mu\text{L}$  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)。
- ④ $4^\circ\text{C}$  12000 g 离心 15 min, 收集上清至新的离心管中; 取 30  $\mu\text{L}$  作为 input, 剩余用于 RNA pull-down 实验,  $-80^\circ\text{C}$  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  $\mu\text{L}$  蛋白酶抑制剂 (按 0.5% 添加) 和 2  $\mu\text{L}$  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  $4^\circ\text{C}$  过夜。
- ②将 Protein A/G 琼脂糖微珠上下颠倒混匀, 每组取 40  $\mu\text{L}$  琼脂糖微珠到新的无 RNase 离心管中。
- ③每组加入 200  $\mu\text{L}$  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  $4^\circ\text{C}$  孵育 2 h。
- ⑥ $4^\circ\text{C}$  500 g 离心 5 min, 弃上清。
- ⑦每组加入 500  $\mu\text{L}$  漂洗液, 颠倒混匀 30 次,  $4^\circ\text{C}$  500g 离心 5 min, 弃上清。
- ⑧重复上步操作一次。
- ⑨再次加入 500  $\mu\text{L}$  漂洗液, 颠倒混匀 30 次; 取 100  $\mu\text{L}$  移入新离心管中用于蛋白检测, 剩余 400  $\mu\text{L}$  (标注为管 2) 用于 RNA 提取, 两管分别  $4^\circ\text{C}$  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 $\mu$ 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 $\mu$ 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  $\mu$ 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:

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。

