

Protein G RIP 试剂盒（动物）**RNA Immunoprecipitation (RIP) Kit, Protein G Agarose****产品信息**

| 货号 | 产品名称 | 规格 |
|------------|--|------|
| FI8703-12T | RNA Immunoprecipitation (RIP) Kit, Protein G Agarose | 12 次 |
| FI8703-24T | RNA Immunoprecipitation (RIP) Kit, Protein G Agarose | 24 次 |
| FI8703-40T | RNA Immunoprecipitation (RIP) Kit, Protein G Agarose | 40 次 |

产品描述

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）。

试剂盒组分

| 编号 | 名称 | 12T 规格 | 24T 规格 | 40T 规格 | 储存条件 |
|----|--------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------|
| ① | Protein G 树脂 | 500 μ L | 1 mL | 1.7 mL | 4 $^{\circ}$ C, 1 年 |
| ② | 裂解缓冲液 | 7 mL | 14 mL | 24 mL | 4 $^{\circ}$ C, 1 年 |
| ③ | 漂洗液 | 25 mL | 50 mL | 84 mL | 4 $^{\circ}$ C, 1 年 |
| ④ | 洗脱缓冲液 | 550 μ L | 1.1 mL | 1.8 mL | -20 $^{\circ}$ C, 1 年 |
| ⑤ | 增强型蛋白酶抑制剂 | 190 μ L | 380 μ L | 640 μ L | -20 $^{\circ}$ C, 1 年 |
| ⑥ | RNase 抑制剂 | 50 μ L | 100 μ L | 170 μ L | -20 $^{\circ}$ C, 1 年 |
| ⑦ | 中和液 | 55 μ L | 110 μ L | 180 μ L | 4 $^{\circ}$ C, 1 年 |
| ⑧ | 10 mL 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 μ L 树脂。由于每次 IP 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 IP 至少需要使用 2 个反应的试剂量。

额外所需材料

1. 自备试剂：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. 吸取树脂后，剩余树脂请用封口膜封好再存放，防止保存液蒸发。
5. 请务必使用无 RNase 的实验材料：如离心管、枪头等。
6. 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。
7. 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。
8. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

II 操作步骤

1. 样本裂解

1.1 动物细胞

- (1) 实验组和对照组一共取 $2\times 10^7\sim 4\times 10^7$ 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，加入 0.6~1 mL 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 5 s。
- (4) 4°C 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，剩余上清平分为两份用于 RIP 实验（记为实验组和对照组），置于冰上备用或 -80°C 保存。

1.2 动物组织

- (1) 采集新鲜组织，切为小块，用预冷的 PBS (RNase-free) 清洗组织 2~3 次，彻底去除血液等成分，放入液氮中迅速降温， -80°C 冷冻保存或直接进行下步操作。
- (2) 实验组和对照组一共取 0.2~0.4 g 干净组织，用液氮充分研磨，转移粉末至预冷的新的无 RNase 离心管中。
- (3) 将样本置于冰上，加入 0.6~1 mL 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。
- (4) 冰上超声破碎至溶液基本澄清。
- (5) 4°C 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，剩余上清平分为两份用于 RIP 实验（记为实验组和对照组），置于冰上备用或 -80°C 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。根据经验，样本蛋白浓度通常不低于 $3\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，总量约 1~3 mg。
- ii. 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⑧10 mL 离心管，加入实验组和对照组总共所需的 3.8 mL ③漂洗液、19 μ L ⑤蛋白酶抑制剂（按 0.5%添加）和 2 μ L 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 4 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 或过夜。
- (2) 将①Protein G 树脂上下颠倒混匀，每组取 40 μ L 树脂到新的无 RNase 离心管中。
- (3) 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。
- (4) 重复上步漂洗操作一次。
- (5) 向预洗好的树脂中加入步骤（1）的样本&抗体混合物，放混匀仪上室温孵育 1 h 或 4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。
- (6) 4 $^{\circ}$ C 500 g 离心 5 min，弃上清。
- (7) 每组加入 500 μ L 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，4 $^{\circ}$ C 500 g 离心 5 min，弃上清。
- (8) 重复上步漂洗操作一次。
- (9) 再次加入 500 μ L 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次；取 100 μ L 移入新离心管中用于蛋白检测（标注为管 1），剩余 400 μ L 用于 RNA 提取（标注为管 2），两管分别 4 $^{\circ}$ C 500 g 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 μ L 1 \times SDS-PAGE 上样缓冲液，95 $^{\circ}$ C 加热 3 min。
- (2) 12000 g 离心 30 s，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：

- (1) **方案 1：**向管 2 的树脂中加入 40 μ L ④洗脱缓冲液，涡旋震荡 20 s，放混匀仪上室温洗脱 10~15 min；涡旋震荡 20 s，4 $^{\circ}$ C 12000 g 离心 5 min；收集上清至新的无 RNase 离心管中，加入 4 μ L ⑦中和液；再加入 1 mL Trizol，室温静置 5 min；4 $^{\circ}$ C 12000 g 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 12000 g 离心 15 min，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 $^{\circ}$ C 12000 g 离心 10 min，管底可见 RNA 沉淀，弃上清。
- (6) 加入 1 mL 75%乙醇（DEPC 水或 RNase-free 水配制）。
- (7) 4 $^{\circ}$ C 12000 g 离心 10 min，弃上清；5000 g 快速离心 1 s，小心吸尽液体。
- (8) 待 RNA 略干后，加入 20 μ L DEPC 水或 RNase-free 水溶解，-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。

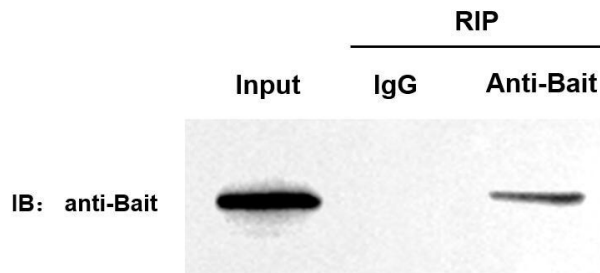
问题解决

| 问题 | 可能原因 | 解决方案 |
|-----------------|--------------------------|--------------------------------|
| 获得的诱饵蛋白量少 | 抗体无法结合诱饵蛋白 | 更换抗体, 可以选择另一种识别不同抗原表位的抗体 |
| | 样品中的诱饵蛋白含量低 | 提高样本用量 |
| 洗脱下的抗体条带掩盖了诱饵蛋白 | 诱饵蛋白的分子量大约是 50kDa 或 25kD | Western blot 选择特异性抗重链或轻链的二抗 |
| | | Western blot 选择与 RIP 实验不同种属的抗体 |
| 获得的 RNA 量少 | 样本量不够 | 提高样本用量或采用 2 倍体系进行实验 |

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

