

| 货号 | 名称 | 规格 | 存储 |
|-----------|-------------------------|-----|------|
| F1519-12T | Protein A/G RIP 试剂盒（植物） | 12T | -20℃ |
| F1519-24T | Protein A/G RIP 试剂盒（植物） | 24T | -20℃ |
| F1519-40T | Protein A/G RIP 试剂盒（植物） | 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 A/G 磁珠沉淀复合物，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 A/G 磁珠 | 500 μ L | 1 mL | 1.7 mL | 4℃，1 年 |
| ② | 裂解缓冲液 | 7mL | 14mL | 24 mL | 4℃，1 年 |
| ③ | 漂洗液 | 25mL | 50mL | 84mL | 4℃，1 年 |
| ④ | 洗脱缓冲液 | 550 μ L | 1.1mL | 1.8mL | 4℃，1 年 |
| ⑤ | 蛋白酶抑制剂 | 190 μ L | 380 μ L | 640 μ L | -20℃，1 年 |
| ⑥ | RNase 抑制剂 | 50 μ L | 100 μ L | 170 μ 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 μ 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、冷冻或剧烈涡旋磁珠，禁止长时间置于磁场，这些操作可能会引起磁珠聚团，降低结合活性。
2. 为保证磁珠均匀分布，请在使用前通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀磁珠。
3. 请务必使用无 RNase 的实验材料：如离心管、枪头等。
4. 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。
5. 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) 实验组和对照组一共取 0.4~0.6 g 植物组织，用 RNase-free 水清洗干净，置于研钵中，用液氮充分研磨，再转移粉末至预冷的、新的无 RNase 离心管中。
- (2) 将样本置于冰上，加入 1 mL 预冷的②裂解缓冲液、10 μ L⑤蛋白酶抑制剂（按 1%添加）和 5 μ L⑥RNA 酶抑制剂（按 0.5%添加），吹打混匀。
- (3) 冰上超声破碎至溶液基本澄清。
- (4) 4℃ 12000g 离心 15min，收集上清至新的无 RNase 离心管中。

(5) 取 30 μ L 作为蛋白 input, 取 30 μ L 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 $^{\circ}$ 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, 应提前摸索好合适的条件。样本蛋白浓度通常不低于 5 μ g/ μ L, 总量约 2~3 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 ⑦10 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, 放混匀仪上室温孵育 1~2 h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜。

(2) 将 ①Protein A/G 磁珠上下颠倒混匀, 每组取 40 μ L 磁珠到新的无 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) 重复上步操作一次。

(5) 向磁珠中加入步骤 (1) 的样本&抗体混合物, 放混匀仪上室温孵育 1h 或 4 $^{\circ}$ 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 500g 离心 5 min, 弃上清。

(8) 重复上步操作一次。

(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 500g 离心 5 min, 弃上清, 保留树脂。

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。

(2) 放磁力架上静置 1 min, 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 ④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 的磁珠中加入 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 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)。

(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 12000g 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 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:** 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 (从磁珠上直接提取 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。

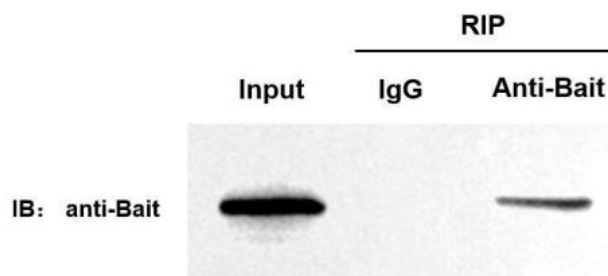
使用案例

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）。

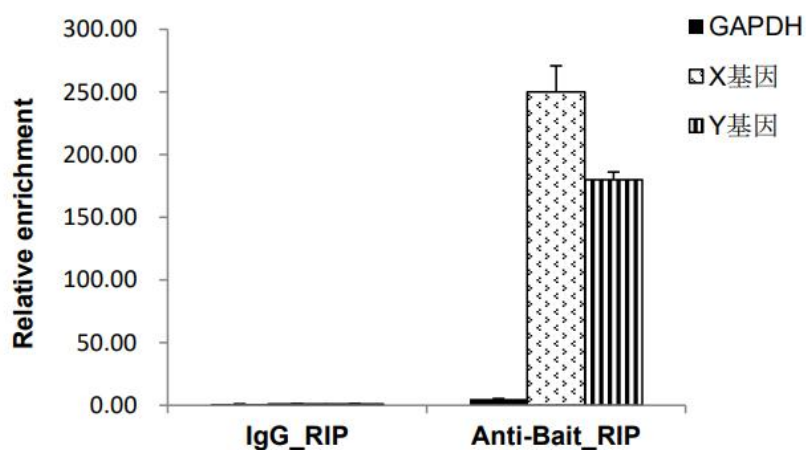
(1) input：样本裂解液；

(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