

Animal RNA-Binding Protein Immunoprecipitation (RIP) Kit

货号：NR3141C

目 录

1. 产品介绍	1
2. 试剂盒操作流程	2
3. 试剂盒操作说明	4
5. 注意事项	5
6. 常见问题	6

1. 产品介绍

1.1 试剂盒简介

RIP(RNA Binding Protein Immunoprecipitation Assay, RNA 结合蛋白免疫沉淀)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过程中的有力工具。RNA-Binding Protein Immunoprecipitation (RIP) Kit 是为 RNA 结合蛋白免疫沉淀(RIP)实验精心设计的一站式解决方案。它整合了优化的缓冲液系统、高性能的亲和介质和经过验证的实验流程, 旨在帮助研究者高效、可靠地富集与特定蛋白质结合的 RNA 片段。本试剂盒具有以下的核心优势:

- ◇ 卓越的信噪比: 独特的洗涤配方有效降低非特异性背景, 确保富集片段的高度特异性, 为下游分析 (qPCR, RIP-seq) 提供纯净的数据。
- ◇ 高效结合与洗脱: 优化的抗体-染色质结合条件及温和高效的洗脱缓冲液, 最大化目标复合物的回收率。
- ◇ 操作简便省时: 流程经过精心优化和标准化, 显著缩短手工操作时间, 减少步骤间差异, 提升实验可重复性, 即使是 RIP 新手也能快速上手并获得可靠结果。

- ◇ 广泛兼容性：兼容多种抗体类型（单抗、多抗），并能无缝衔接下游的 qPCR 或高通量测序（RIP-seq）平台。
- ◇ 稳定可靠：所有组分均经过严格的质量控制和批次间一致性测试，确保实验结果的稳定性和可重复性。

1.2 试剂盒组分

表 1. RNA-Binding Protein Immunoprecipitation (RIP) Kit 组分

名称	12 Tests 规格	24 Tests 规格	储存条件
Protein A/G Magnetic Beads	500 μ L	1 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
Lysis Buffer	7 mL	14 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
Wash Buffer	25 mL	50 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
Elution Buffer	550 μ L	1.1 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
Protease inhibitor	190 μ L	380 μ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
RNase inhibitor	50 μ L	100 μ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年

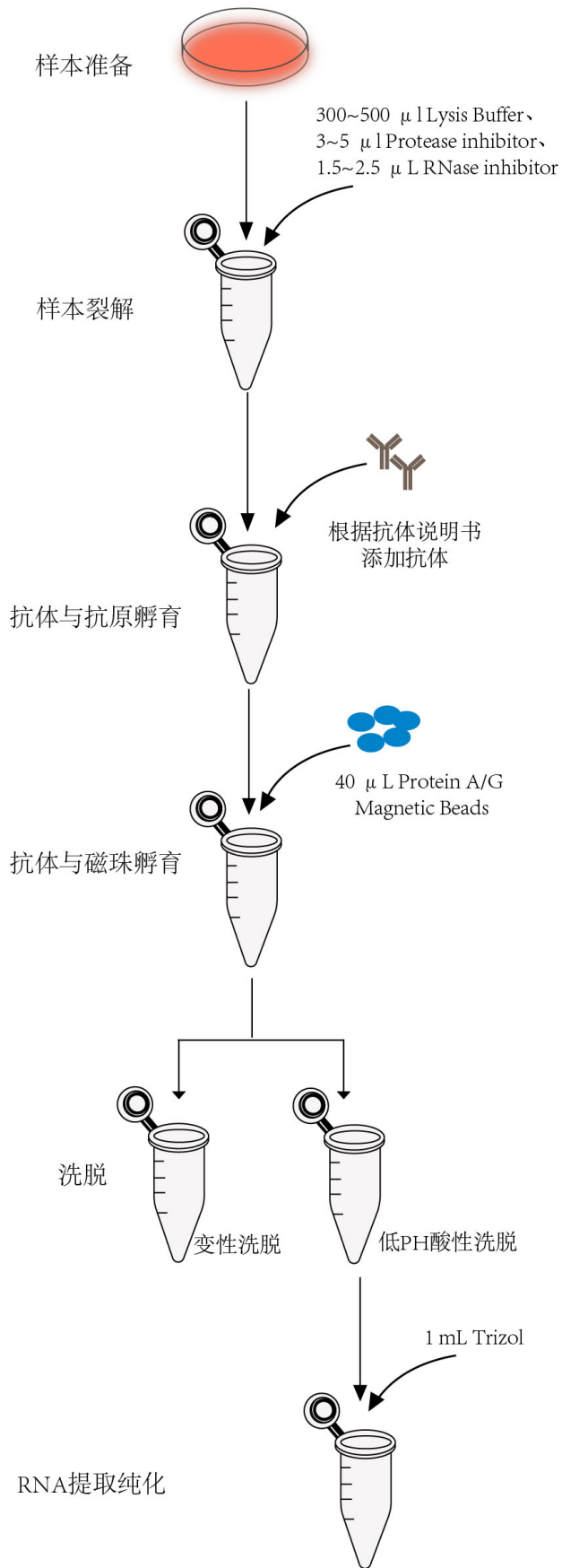
* 注意：请根据提示，将 Protease inhibitor 和 RNase inhibitor 放置于-20 $^{\circ}$ C保存，试剂盒置于 4 $^{\circ}$ C保存，避免阳光直射。

另外，本试剂盒不包含所有必需试剂/耗材，请参照清单另行准备：

试剂：① 诱饵蛋白 IP 抗体（建议选用 RIP 抗体）；② Normal IgG；③ PBS 缓冲液；④ RNase-free 水；⑤ Trizol；⑥ 氯仿；⑦ 75%乙醇；⑧ 异戊醇；⑨ 氯仿。

仪器：① 超声仪（用于裂解样本）；② 低温离心机；③ 混匀仪；④ 磁力架；

2. 试剂盒操作流程图



3. 试剂盒操作说明

* 注意：以下操作均为 1 组用量，设计多组样本，试剂用量请按照实际使用量配置。如设计实验组和对照组，则为操作说明用量的 2 倍，以此类推。

3.1 样本准备

(1) 贴壁细胞样本

吸净培养皿中的培养基，并加入 PBS 后用细胞铲将细胞刮入离心管中（或加入适量 PBS 清洗 1 次细胞后用胰酶消化细胞，加入血清终止反应后收集于离心管中），离心去掉上清，再加入 PBS 清洗细胞 2 次，离心后去除上清收集沉淀样本，细胞总量 $1\sim 2\times 10^7$ 个。

(2) 悬浮细胞样本

将细胞悬液转移至样品管中，离心弃掉上清。去除上清后用 PBS 清洗细胞 2-3 次，直至把所有的培养基去除干净，细胞总量 $1\sim 2\times 10^7$ 个。

(3) 动物组织样本

组织离体 15 分钟内，取样本量为 100~200 mg，立即将其用消毒过的刀具切成小块，用 PBS 或生理盐水洗净血液、体液等影响实验结果的残留成分，于液氮中进行充分研磨，转移粉末至新的无 RNase 离心管中。

3.2 样本裂解获取蛋白液

(1) 样本加入 300~500 μL 预冷的 Lysis Buffer、3~5 μL Protease inhibitor 和 1.5~2.5 μL RNase inhibitor（按 100:1:0.5 添加），吹打混匀。

a. 动物细胞：冰上超声破碎至溶液基本澄清，若无超声条件，可置于冰上裂解 30 min，间隔手动混匀。

b. 动物组织：冰上超声破碎至溶液基本澄清。

(2) 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的无 RNase 离心管中，-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。收集得到的样本可各取 30 μL 作为 RNA input 和蛋白 input，剩余用于 RIP 实验。

* 注意：当样本不能完全裂解时（溶液很浑浊），可以适当增加裂解缓冲液的用量继续裂解。如果样本中目标蛋白或 RNA 丰度较低，或两者结合较弱，也可以增加初始样本量。300 μL 为裂解缓冲液的最小使用体积，当样本增加时，裂解液缓冲液可等比例增加，但总孵育体积最大不超过离心管体积的 2/3。超声条件因样本类型和超声设备而异，可提前摸索好合适的条件。

3.3 漂洗液准备

取出 10 mL 离心管，加入 2 mL Wash Buffer、10 μ L Protease inhibitor（蛋白酶抑制剂与漂洗液按 1:200 添加）和 1 μ L RNase inhibitor（蛋白酶抑制剂：RNase 抑制剂：漂洗液按 1:0.1:200 添加），混合均匀，冰上保存，现配现用。

3.4 磁珠漂洗

- a. 每组实验取 40 μ L 的 Protein A/G Magnetic Beads，加入**步骤 3.3**的 200 μ L 漂洗液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 使磁珠全部吸附于磁力架，弃上清。
- b. 再次加入**步骤 3.3 配置**的 200 μ L 漂洗液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 使磁珠全部吸附于磁力架，弃上清。

3.5 RNA 免疫共沉淀

- (1) 向**步骤 3.2 制备**的样本裂解液中按抗体说明书加入适量抗体/Normal IgG，放混匀仪上室温孵育 1~2 h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜。
- (4) 向**步骤 3.4 制备**的磁珠中加入**上述步骤 (1)**的样本/抗体混合物，放混匀仪上 4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 或常温赋予孵育 1h，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (5) 加入 500 μ L **步骤 3.3 配置**漂洗液，颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；重复该漂洗操作 1 次。
- (6) 再次加入 500 μ L **步骤 3.4 配置**漂洗液，颠倒混匀 30 次，之后取 100 μ L 移入新的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）；两管分别放磁力架上静置 1 min 并弃上清。

3.6 洗脱

- a. 向管 1 中加入 20 μ L 2 \times 上样缓冲液并煮沸 3 min，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 Western-Blot 检测。
- b. 向管 2 中加入 30 μ L Elution Buffer，涡旋震荡 20s，放混匀仪上室温洗脱 10~15 min，涡旋震荡 20s；1000 g 离心 20 s，放磁力架上静置 1 min，收集上清新的无 RNase 离心管中。

3.7 RNA 分离纯化

可按照以下步骤或购买 RNA 提取试剂盒来提取 RNA。

-
- (1) 向管 2 的上清液中加入 1 mL Trizol, 室温静置 5 min, 4 °C 12000 g 离心 10 min。
 - (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 °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 °C 沉淀过夜。
 - (5) 4 °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°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 水或溶解, -80 °C 保存或直接进行反转录。

4. 注意事项

- (1) Protease inhibitors 为一种细胞毒性化学物质, 建议在通风橱或经认证的生物实验台中使用, 且注意避光保存。
- (2) 在进行实验设计时, 建议加入对照组, 方便后续实验结果分析。
- (3) 请务必使用无 RNase 的实验材料: 如离心管、枪头等。
- (4) 请勿使磁珠干燥、冷冻或剧烈涡旋, 会导致磁珠聚集而降低结合能力。磁珠在使用前, 将磁珠反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀磁珠。
- (5) 为了您的健康, 请穿戴实验服并佩戴一次性手套进行实验操作。

5. 常见问题

Q: 获得的 RNA 复合产物少的原因有哪些? 怎么解决?

- (1) 样本量较少, 可通过提高细胞样本用量或增加细胞量与抗体磁珠的比例来解决;
- (2) 孵育时间较短, 可延长孵育时间, 但需要注意孵育时间过长也可能会导致非特异性结合增多;

Q: 诱饵蛋白条带大小与抗体非特异性条带重叠了, 怎么解决?

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, 或 Western blot 选择与 RIP 实验不同种属的抗体。

Q: 获得的诱饵蛋白量少, 怎么解决?

- (1) 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。

(2) 样品中的诱饵蛋白含量低, 提高样本用量。