货号	名称	规格	存储
F1507-12T	GFP-Tag RIP 试剂盒（动物）	12T	-20℃
F1507-24T	GFP-Tag RIP 试剂盒（动物）	24T	-20℃

产品简介

本试剂盒采用 Anti-GFP纳米抗体磁珠来完成GFP或EGFP标签融合蛋白的免疫共沉淀实验。 Anti-GFP磁珠偶联的是经过严格筛选、优化并重组表达的GFP纳米抗体，所以IP洗脱液中不会有抗体轻、重链污染。

实验前先将GFP或EGFP标签与目标蛋白在细胞或组织中融合表达。裂解样本后，将 Anti-GFP磁珠加入样本中，磁珠上的GFP纳米抗体与样本中的GFP融合蛋白及其结合蛋白形成复合体，去除未结合的物质后，洗脱并分离蛋白与RNA，再利用qPCR或高通量测序（Seq）方法来鉴定或筛选与目标蛋白结合的RNA。

试剂盒成分

编号	名称	12T 规格	24T 规格	储存条件
①	Anti-GFP 磁珠	250 μL	500 μL	4℃，1 年
②	裂解缓冲液	7mL	14mL	4℃，1 年
③	漂洗液	25mL	50mL	4℃，1 年
④	洗脱缓冲液	550 μL	1.1mL	-20℃，1 年
⑤	蛋白酶抑制剂	190 μL	380 μL	-20℃，1 年
⑥	RNase 抑制剂	50 μL	100 μL	-20℃，1 年
⑦	中和液	55 μL	110 μL	4℃，1 年
⑧	10mL 离心管	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 μL 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. 自备试剂：GFP 抗体、PBS、RNase-free 水、Trizol、 氯仿、异丙醇、75%乙醇。
2. 所需仪器：磁力架、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

1.1 动物细胞

(1) 实验组和对照组各取 $1*10^7$～$2*10e^7$个细胞，用预冷的 PBS（RNase-free）清洗细胞 2～3 次，每次 4℃ 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，每组加入 300～500 μL 预冷的②裂解缓冲液、3～5 μL ⑤蛋白酶抑制剂（按 1%添加）和 1.5～2.5 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；如果无超声条件，可置于冰上裂解 30 min，期间每 10 min 涡旋混匀一次，每次 5s；

(4) 4℃ 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 30μL 作为 RNA input，剩余用于 RIP 实验，置于冰上备用或-80℃保存。

1.2 动物组织

(1) 采用预冷的 PBS（RNase-free）清洗新鲜组织 2～3 次，彻底去除血液等成分；如果样本为冷冻组织，在取样时也需要进行清洗操作；

(2) 实验组和对照组各取 0.1～0.2 g 干净组织，用液氮在研钵中充分研磨，转移粉末至预冷的、新的无 RNase 离心管中；

(3) 将样本置于冰上，每组加入 300～500μL 预冷的②裂解缓冲液、3～5μL⑤蛋白酶抑制剂（按 1%添加）和 1.5～2.5μL 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℃ 12000 g 离心 15 min，收集上清至新的无 RNase 离心管中；

(6) 取 30 μL 作为蛋白 input，取 30 μL 作为 RNA input，剩余用于 RIP 实验，置于冰上备用或-80℃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 μg/μL，总量约 2～3 mg。

iii.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 mL③漂洗液、19μL ⑤蛋白酶抑制剂（按 0.5%添加）和 2μL 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) 将① Anti-HA 磁珠上下颠倒混匀，每组取 20μL 磁珠到新的无 RNase 离心管中。

(2) 每组加入 200μL 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1min 并弃上清。

(3) 重复上步操作一次。

(4) 向磁珠中加入相应组别的样本裂解液（步骤 1 制备），放混匀仪上室温孵育 1 h 或 4 ℃孵育 4 h。

(5) 放磁力架上静置 1 min 并弃上清。

(6) 每组加入 500 μL 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。

(7) 重复上步操作一次。

(8) 再次加入 500 μL 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，取 100 μL 移入新离心管中用于蛋白检测（标注为 管 1），剩余 400 μL 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，保留磁珠。

4. 诱饵蛋白检测

(1) 向管 1 的磁珠中加入 20μL 1×SDS-PAGE 上样缓冲液，95 ℃加热 3 min。

(2) 放磁力架上静置 1min，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 40μL④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，1000g 离心 5min，放磁力架上静置 1 min，收集上清新的无 RNase 离心管中；向上清液中加入 1 mL Trizol，室温静置 5 min，4℃ 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℃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℃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℃ 沉淀过夜。

(5) 4 ℃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）。

本产品仅限科研。

(7) 4℃ 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 μL DEPC 水或 RNase-free 水或溶解，- 80℃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

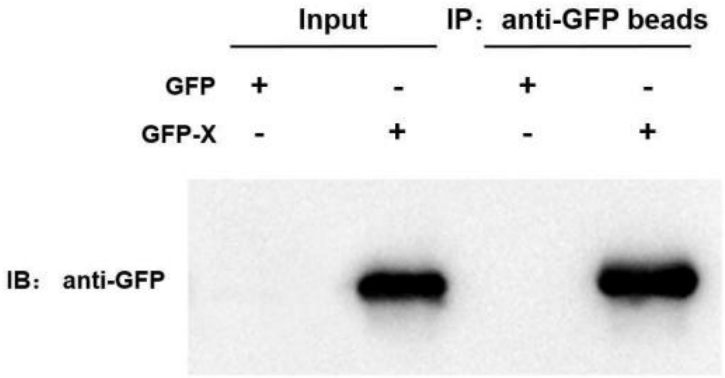
问题	可能原因	解决方案
获得的复合产物少	样本量不够	提高样本用量
	孵育时间不够	延长孵育时间（如孵育过夜），但需要注意孵育时间过长也可能会导致非特异性结合增多
	RNA 探针量不够	提高 RNA 探针用量
SDS-PAGE 检测有很多非特异结合的条带	非特异性的蛋白结合在磁珠上	增加漂洗时间和次数，或样本预处理：先与磁珠孵育，去除非特异结合蛋白

使用案例

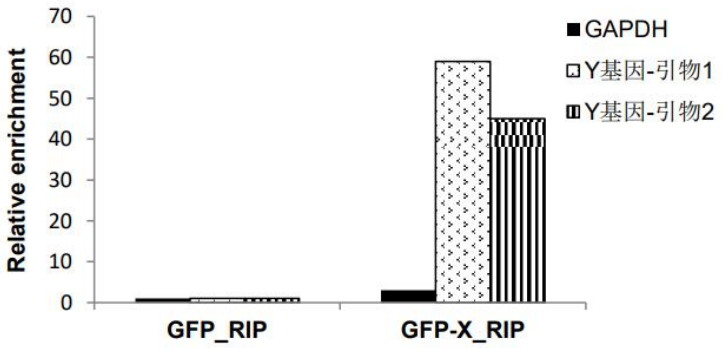
实验目标：检测诱饵蛋白（GFP-X）与待测基因（B）是否结合。

(1) 实验组：表达 GFP-X 的样本采用 Anti-GFP 磁珠进行 RIP 实验；

(2) 对照组：表达 GFP 空载体的样本采用 Anti-GFP 磁珠进行 RIP 实验。



诱饵蛋白的 western-blot 检测图



RIP-qPCR 结果统计图