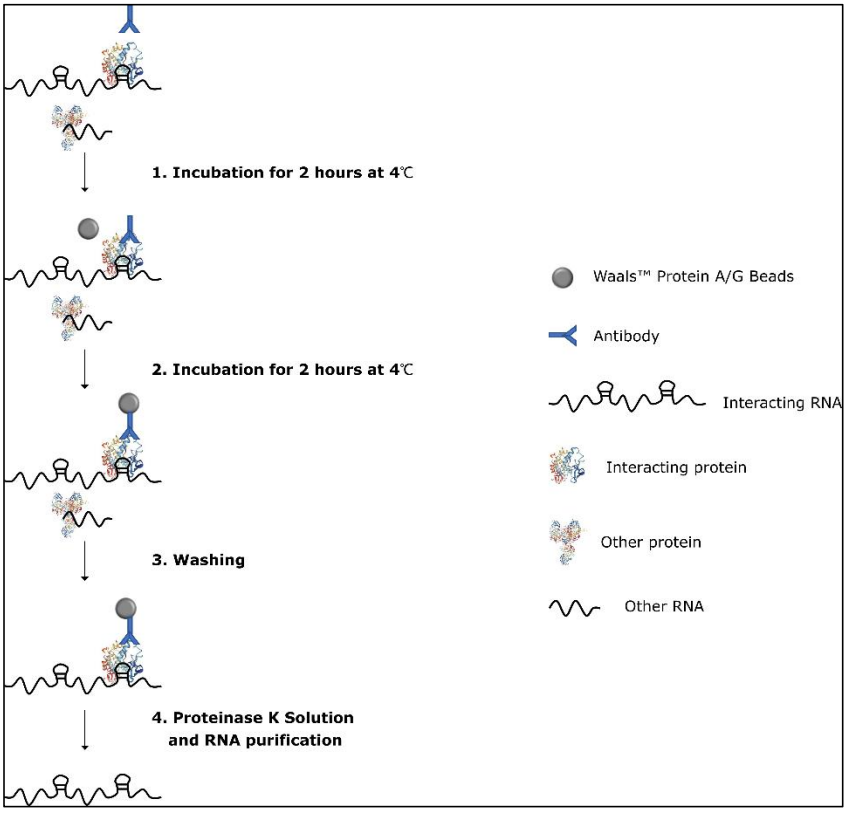
Waals™ RNA IP (RIP) Kit

操作说明

- **描　述：**Waals™ RNA IP (RIP) Kit，包含 Protein A/G Magnetic Beads, Waals™ RNA IP Lysis Buffer, RNA IP Buffer, RNase Inhibitor, 0.1 M DTT, 0.5 M EDTA, DNase I, Proteinase K, 10% SDS, Solution I, Solution II, Solution III, Nuclease-Free Water。
- **自备试剂：**蛋白酶抑制剂、氯仿:异戊醇(25:24:1)、无水乙醇
- **试剂盒储存：**Waals™ RNA IP (RIP) Kit, Part I，4℃储存（勿冷冻）；Waals™ RNA IP (RIP) Kit, Part II，-20℃储存。
- **介　绍**

细胞中存在大量蛋白与 RNA 的复合物，它们的相互作用发挥重要的生物学功能。Waals™ RNA IP Kit 提供 Protein A/G 磁珠，可稳定结合目标抗体；通过与细胞裂解产物孵育可高效富集目的蛋白及其复合物中的 RNA；通过 RNA 纯化可用于后续研究，如 qRT-PCR、RNA-sequencing 等。

操作流程



RNA IP 实验流程图

操作步骤

■ 注意事项

1. 用标准的 RNA IP 裂解 buffer (e.g., Waals™ RNA IP Lysis Buffer)并加入蛋白酶抑制剂（必要时添加磷酸酶抑制剂）处理细胞。
2. 至少需要 1 × 10^7 个细胞用于 RNA IP 实验。**【注】**若被检测的 RNA 含量较低则需要更多的细胞。
3. 确保样品是新鲜的且无细菌等污染。
4. 制备好的样品(Cell Lysates)可吸取 10%体积的样品作为 Input，置于-80℃保存。

■ 细胞裂解：

1. 吸去细胞培养基，用预冷的 PBS 洗涤细胞 2-3 次，去除残留的培养基。
2. 加入适量的Waals™ RNA IP Lysis Buffer (通常每 1 - 5 × 10^7 个细胞加入 500 µL 裂解缓冲液)。**【注】**确保裂解液已添加蛋白酶抑制剂。
3. 将细胞置于冰上裂解 10-15 分钟，期间每隔 5 分钟轻轻涡旋或吹打一次，确保细胞充分裂解。
4. 裂解后，将细胞裂解液转移至预冷的离心管中，4℃, 12,000 rpm 离心 10 分钟，去除细胞碎片和未裂解的细胞。
5. 收集上清液（即 Cell Lysates），置于冰上备用。

■ **免疫复合物制备**

1. 用 Waals™ RNA IP Kit 提供的试剂按照下表配制 **RNA IP Mix**：

试剂名称	体积 (µL)	终浓度
RNA IP Buffer	300	-
0.1 M DTT	10	1 µM
RNase Inhibitor	2.5	100 U
0.5 M EDTA	30	15 µM
Cell Lysates	500 µL（约 500 µg 总蛋白）	-
Antibody (Test or IgG)	5 µg	-
用 RNA IP Buffer 补足至	1 mL	

2. 室温**旋转**反应 2 小时或 4℃**旋转**反应过夜。**【注】**须在旋转仪上进行反应。

■ **RNA IP**

1. 将 Protein A/G Magnetic Beads 充分混匀，吸取 50 µL 于新的无菌无酶离心

管中。

2. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
3. 将离心管从磁力架上取出，加入 100 μL RNA IP Buffer (4℃预冷)，重悬磁珠。
4. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
5. 重复步骤 3 和 4，2 次。
6. 将离心管从磁力架上取出，加入 100 μL RNA IP Buffer (4℃预冷)，重悬磁珠。
7. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
8. 将离心管从磁力架上取出，加入 1 mL **RNA IP Mix**，温和重悬磁珠。
9. 4℃**旋转**反应 2-4 小时。
10. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
11. 将离心管从磁力架上取出，加入 500 μL RNA IP Buffer (4℃预冷)，温和混匀。
12. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
13. 重复步骤 11 和 12，3 次。
14. 将离心管从磁力架上取出，加入 500 μL RNA IP Buffer (4℃预冷)，温和混匀。
15. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠，将上清液转移至新的无菌无酶离心管中，用于后续分析。
16. 将离心管从磁力架上取出，加入 100 μL RNA IP Buffer (4℃预冷)于磁珠离心管，再加入 5 μL DNase I (2 U/μL)，温和混匀。
17. 37℃**旋转**反应 10 分钟。
18. 加入 500 μL RNA IP Buffer，温和混匀。
19. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
20. 将离心管从磁力架上取出，加入 500 μL RNA IP Buffer，温和混匀。
21. 用 Waals™ RNA IP Kit 提供的试剂按照下表配制 **Proteinase Mix**：

试剂名称	体积 (μL)
RNA IP Buffer	130
Proteinase K	5
10% SDS	15
	150 μL

22. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
23. 将离心管从磁力架上取出，加入 150 μL **Proteinase Mix**，温和混匀。
24. 55℃**旋转**反应 20 分钟，或每 5 分钟温和重悬 1 次磁珠。

25. 将离心管置于磁力架上，收集上清液于新的无菌无酶离心管，并加入 250 μL RNA IP Buffer 至每管。

■ **RNA Isolation**

1. 加入 400 μL 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)至每管。
2. 涡旋 15 秒，室温 14,000 rmp 离心 10 分钟。
3. 取 350 μL 上清液至新的无菌无酶离心管，并加入 400 μL 氯仿。
4. 涡旋 15 秒，室温 14000 rmp 离心 10 分钟。
5. 取 300 μL 上清液至新的无菌无酶离心管。
6. 分别在每管中加入 50 μL Solution I，15 μL Solution II，5 μL Solution III，以及 850 μL 预冷的无水乙醇。
7. 颠倒混匀，置于-20℃或-80℃至少 1 小时或过夜，以沉淀 RNA。
8. 将离心管 14,000 rpm，4℃离心 30 分钟，弃掉上清液。
9. 加入 80%无水乙醇，14,000 rpm，4℃离心 15 分钟，弃掉上清液，空气干燥。
10. 用 10-20 μL Nuclease-Free Water 溶解 RNA 沉淀，置于冰上，或-80℃保存。