

## RIP 试剂盒说明书

产品货号: KT102-01

**产品简介:** RIP 技术 (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, 运用针对目标蛋白的抗体把相应的 RNA-蛋白复合物沉淀下来, 经过分离纯化就可以对结合在复合物上的 RNA 进行分析。本产品适用于大部分的动物细胞和组织的 RIP 实验。本试剂盒包含 12 个 IP 反应

### 试剂盒包装组分:

表 1 试剂盒包装组分信息

4℃保存试剂		
试剂	编号	数量
Cell lysis buffer	SCR-1	10mL
RIP buffer	SCR-2	120mL
0.5M EDTA	SCR-3	500uL
10%SDS	SCR-4	300uL
蛋白 G/A 磁珠	SCR-5	650uL
-20℃保存试剂		
蛋白酶抑制剂	SCR-6	150uL
PMSF	SCR-7	150uL
RNase Inhibitor	SCR-8	65uL
ProteinaseK	SCR-9	250uL
阴性对照抗体 IgG	SCR-10	20uL

### 需要的额外材料:

目的抗体  
旋转仪  
逆转录试剂  
pcr 试剂  
糖原 (可用碧云天糖原)

### 注意事项:

- 1 实验环境为 Nuclease-free 环境, 全过程须使用无 RNase 污染的实验用具和试剂, 操作过程中也要防止 RNase 污染
- 2 操作过程中不要剧烈吹打磁珠, 控制孵育时间和清洗条件
- 3 用酚: 氯仿: 异戊醇 (125:24:1) 抽提 RNA 过程中, 要小心吸取上清, 避免吸到下层有机相

4 乙醇沉淀 RNA 后要小心移除上清，防止 RNA 丢失

**实验过程摘要：**

如图 1 所示，首先将细胞进行裂解，然后将细胞裂解液与抗体-磁珠结合形成抗体-蛋白 G/A 磁珠复合物孵育，然后经适当条件洗涤使与蛋白结合的 RNA 与孵育液中的其他成分分离。最后通过洗脱缓冲液将 RNA 从磁珠上洗脱下来，经纯化回收后获得 RIP 产物 RNA。产物可通过 q-pcr 检测特定的 RNA，或通过测序分析。

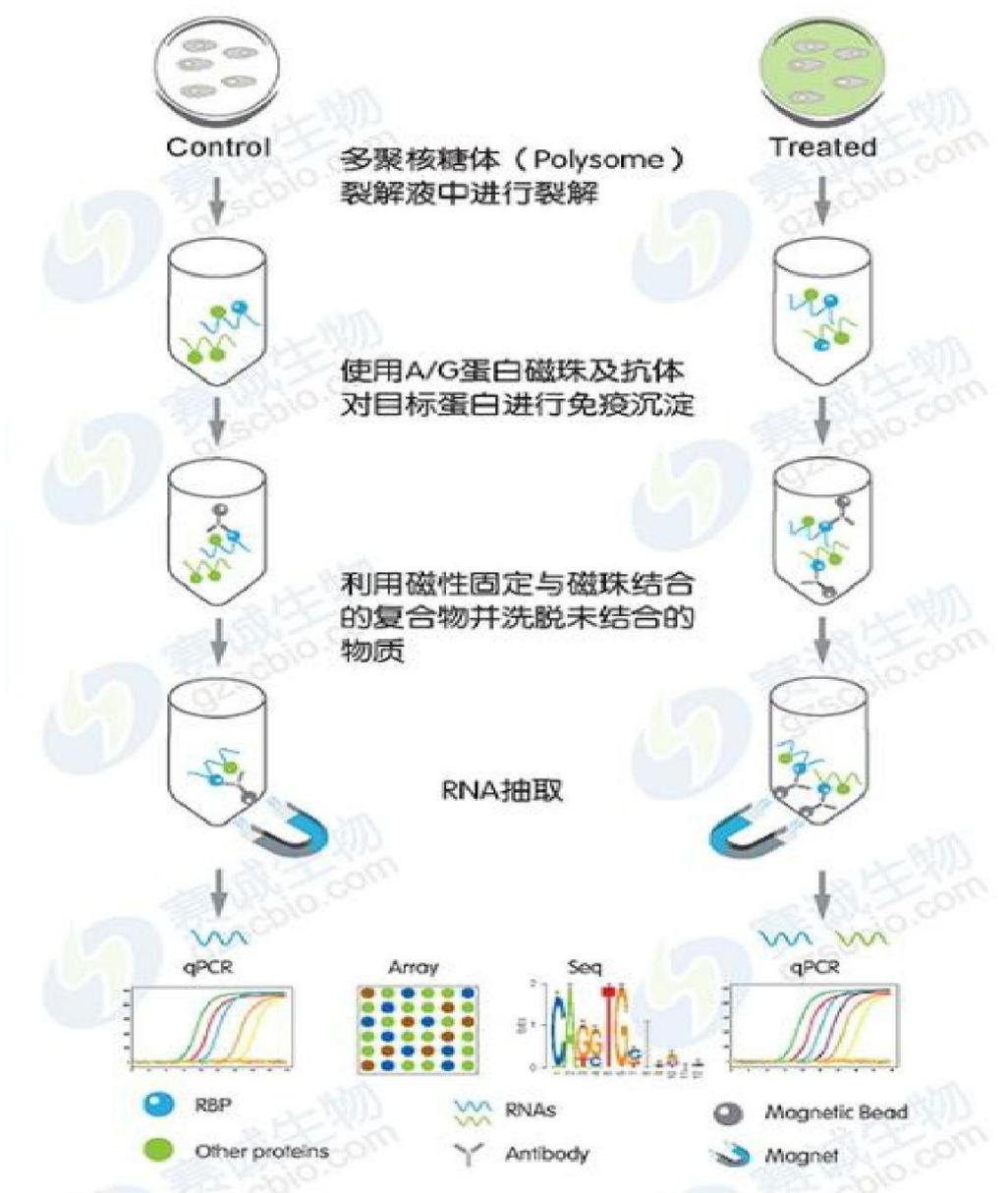


图 1 RIP 试剂盒实验过程示意图

## 实验步骤

### A、裂解细胞

细胞量：约  $2 \times 10^7$  个

- 1 用细胞刮将细胞刮下来，收集至无 RNA 酶 EP 管。
- 2 1500rpm, 4°C 离心 5min, 弃上清, 收集细胞, 用 PBS 溶液 (每 mL 加入 12uL PMSF, 10uL 蛋白酶抑制剂) 清洗细胞 1-2 次
- 3 加入 1mL Cell lysis buffer, 使用前每 mL 裂解液加入 12uLPMSF, 10uL 蛋白酶抑制剂, 吹打均匀后于 4°C 冰箱翻转裂解 1-2h。
- 4 4°C, 12000rpm 离心 15min。将上清转移到一个新的 1.5mL 的 EP 管中, 标识清楚。裂解液继续 IP 实验或者储存在 -80°C

### B、磁珠的准备

上下轻微颠倒重悬磁珠;

标记实验所需的无 RNA 酶 1.5ml EP 管, 包括 input 组, 目的抗体组, 阴性对照抗体 IgG 组。

吸取 50uL 重悬后的磁珠悬液于每个无 RNA 酶 1.5mL EP 管中, 去上清 (input 组不加磁珠和抗体);

每管加入 500uL RIP Buffer, 轻微上下颠倒混匀清洗磁珠,

3000rpm 离心 1 min, 去上清, 重复清洗磁珠 2 次, 去上清;

用 500uL 的 RIP Buffer 重悬磁珠, 加入 5uL 阴性 IgG 抗体或 2-5ug 目的抗体于相应 EP 管中;

封口膜封口后, 置于 4°C 冰箱翻转孵育 6~8 小时。

### C、RNA 结合蛋白免疫沉淀

- 1 将 4°C 冰箱的磁珠-抗体混合物 3000rpm 离心 2min, 去上清, 用 500uL RIP buffer 清洗磁珠 1 次, 去除上清后依次加入表 2 试剂:

表 2 RNA-蛋白质结合反应的主混合物的反应组分

试剂	用量
RIP buffer	860uL
RNase Inhibitor	5uL
0.5M EDTA	35uL

- 2 加入 100-300uL 细胞裂解液, 上下颠倒轻微混匀, 封口, 置于 4°C 冰箱翻转孵育过夜, 剩余裂解液取 10-30uL (10%) 作为 input 组于另一 EP 管中

- 3 过夜孵育的磁珠-抗体混合物 3000rpm 离心 2min, 去上清, 然后加入 1mL RIP buffer, 上下颠倒轻微混匀, 清洗磁珠, 3000rpm 离心 1min, 去上清, 重复清洗磁珠 5 次 (共 6 次), 去上清, 磁珠产物进行下一步;

#### D、RNA 纯化

##### 酚：氯仿：异戊醇抽提 RNA：

- 1 于每组（包括 input 组）中分别加入 117uL RIP buffer, 15uL 10%SDS, 18uL ProteinaseK 于 55℃ 孵育 45min;
- 2 3000rpm 离心 5min, IP 组取上清至新的无 RNA 酶 EP 管中, 标识清楚, 加入 250uL RIP Wash buffer (为了使体积增大以便后续吸取水相, 减少 RNA 损失), 然后再加入 400uL 酚：氯仿：异戊醇 (125:24:1), 涡旋振荡充分混匀, 室温静置 5min (于通风橱中操作);
- 3 室温 12000rpm 离心 15min, 小心吸取约 400uL 上层水相于新的无 RNA 酶 EP 管中 (于通风橱中操作);
- 4 加入 3 倍体积无水乙醇和 1-2uL 糖原, 然后于 -20℃ 沉淀过夜;
- 5 4℃, 12000rpm 离心 15-30min, 小心去上清;
- 6 加入 1mL 预冷的 75%乙醇上下轻微颠倒清洗, 4℃, 12000rpm 离心 10min, 弃上清, 室温静置 2-3min 晾干, 加入 10-15uL Water (nuclease-free) 溶解, 得到的溶液为纯化的 RNA, -80℃ 保存。纯化的 RNA 产物可用于后续的 Q-PCR 检测或测序。

##### 或 Trizol 提取 RNA：

- 1 磁珠清洗去上清完成后, 向管中 (包括 input) 加入 500uL 的 trizol 溶液, 涡旋振荡 10s, 室温静置 10min;
- 2 再加入 100  $\mu$  L 氯仿, 涡旋振荡 10s, 在 4℃, 12000rpm 离心 15min 后小心吸取上层水相至新的离心管中;
- 3 加入 2.5 倍体积无水乙醇混匀 (可选择加入 1-2uL 糖原) 后置于 -80℃ 沉淀过夜。
- 4 第二天取出在 4℃, 12000rpm 离心 15min 后小心去除上清, 然后用 75%乙醇清洗沉淀 3 次, 最后一次尽量完全去除上清, 开盖晾干 2-3min, 用 10-15uL RNase-free H<sub>2</sub>O 溶解。得到的溶液为纯化的 RNA, -80℃ 保存。纯化的 RNA 产物可用于后续的 Q-PCR 检测或测序。

**问题解决方案:**

问题	解决方案
抗体裂解物中的免疫蛋白质	在 RIP 实验之前, 通过 Western 确认抗体可以 IP 免疫沉淀感兴趣的 RBP
	选择针对抗原的不同表位的抗体
	从具有固定量 RIP 裂解物的稀释系列抗体中进行 IP, 反之亦然
	确认抗体同种型与蛋白 A 或 G 的免疫沉淀相容
蛋白酶 K 消化不完全	进行蛋白酶 K 消化时, 请确保温度设定在 55° C 左右。蛋白酶 K 将在高于 65° C 的温度下长时间孵育而失活。
低 RNA 产量	大多数 RNA 结合蛋白免疫沉淀不能产生可测量量的 RNA。而通过 RTPCR 可以检测亚纳克量的 RNA
	如果在 cDNA 合成后检测不到 RNA, 请考虑上面的免疫沉淀故障排除。
RNA 降解	确保无 RNA 酶的工作条件和用具, 并且不引入 RNA 酶, 在孵育溶液中使用 RNA 酶抑制剂。
没有检测到 RNA	在-80° C 下增加乙醇沉淀的孵育时间
	RNA 乙醇沉淀物有时非常小。去除上清液时, 一定不要吸收 RNA 沉淀
	在 RIP 分析之前, 确认抗体可以通过 IP 免疫沉淀感兴趣的 RBP
RT-PCR 无产物	增加不同量的 cDNA 加入到 PCR 反应中
	增加扩增反应的循环次数
	确保在 q-pcr 仪上正确设置扩增反应程序
	重新检查引物的正确 Tm
SNRNP70 和 IgG IP 的 PCR 产物之间的数量没有差异	确认抗体可以通过 IP 免疫沉淀感兴趣的 RBP
	确保正确的抗体质量和正确的 RIP 裂解液用于 IP
	减少加入 PCR 反应的 cDNA 量
	减少分析 cDNA 的循环数。重要的是在 PCR 的线性扩增阶段内分析 PCR 产物, 可以测量起始 DNA 的量之间的差异。