



RNA Binding Protein Immunoprecipitation (RIP)Kit

Catalog# JKR23003-24T

Instruction Manual (For Two Groups)

Sufficient reagents for 24 RIP assays per kit.
Store at -20 & 4°C

目录

1. 实验原理	02
2. 技术路线图	03
3. 试剂盒组分	04
4. 操作步骤	04
5. 常见问题	08



1. 实验原理

RIP技术 (RNA Binding Protein Immunoprecipitation, 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动态过程的有力工具。该技术主要是运用目标蛋白的特异性抗体把相应的RNA-蛋白复合物沉淀下来, 然后经过分离纯化对结合在复合物上的RNA进行q-PCR验证或者高通量测序分析。

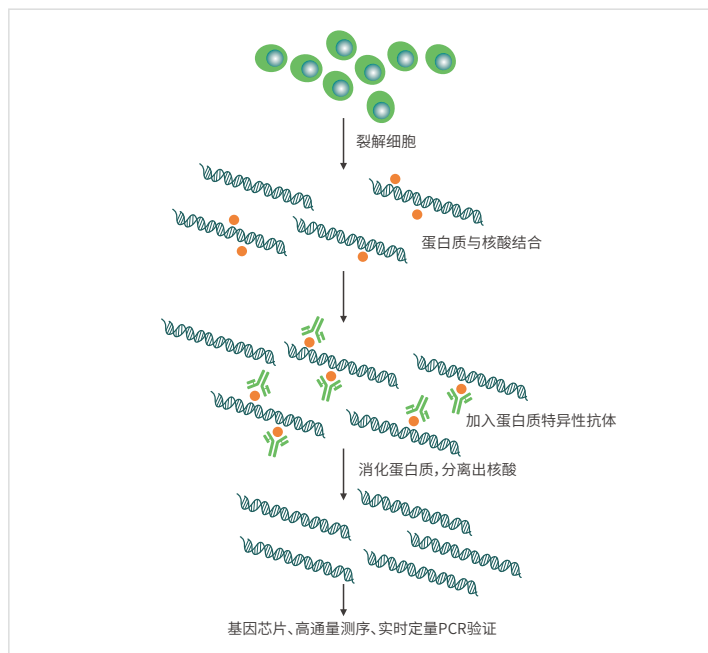
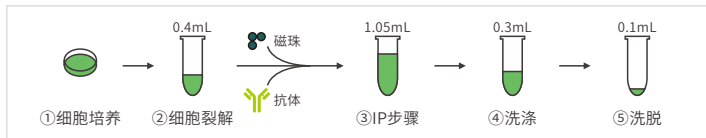


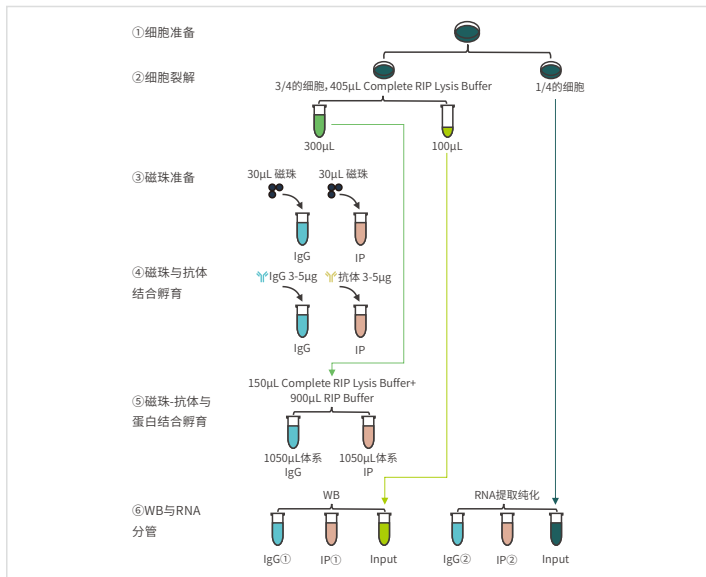
图1.1实验原理图

2. 技术路线图

2.1 实验流程图



2.2 对照设置流程图



3. 试剂盒组分

组分	容量 (24T)	保存温度
RIP Lysis Buffer	14.4mL	4°C
Protease Inhibitor (100X)	60μL	-20°C
RNase Inhibitor	140μL	-20°C
ProteinA/G Magnetic Beads	800μL	4°C
Normal Rabbit IgG (1mg/mL)	120μL	-20°C
Normal Mouse IgG (1mg/mL)	120μL	-20°C
RIP Wash Buffer	200mL	4°C
0.5 M EDTA	1.6mL	4°C
Salt Solution	2.4mL	4°C
DEPC H ₂ O	1.6mL	4°C
Elution Buffer	3.2mL	4°C避光

特别提示1: 需自备Trizol、75%乙醇、氯仿、异丙醇、逆转录试剂盒及荧光染料;

特别提示2: 24T为24次单组 (1组IP或1组IgG) 免疫沉淀实验, 后面的操作步骤中包含了IgG和IP各1组, 需消耗2T试剂。

4. 操作步骤

4.1 样本裂解

4.1.1 动物细胞

- ① 准备405μL Complete RIP Lysis Buffer (400μL RIP Lysis Buffer+4μL Protease Inhibitor (100X)+1μL RNase Inhibitor);
- ② 收集 2×10^7 个细胞样品, 加入 2 mL PBS 洗涤细胞, 离心后弃上清收集细胞沉淀, 预留1/4的细胞样品用于后续input组的RNA提取及纯化 (使用无核酸酶的EP管存放, -80°C保存);

- ③ 向剩余细胞沉淀中加入400 μ L Complete RIP Lysis Buffer重悬,并用移液枪吹打混匀10次,使细胞充分裂解,冰浴30min,每5min涡旋一次,10s/次,裂解完成后用超声波细胞破碎仪冰浴超声5min,20%的功率,超声3s,间歇3s。4 $^{\circ}$ C 12000rpm离心10min,取上清,记为Lysis,并按照150 μ L (IP)、150 μ L (IgG)、100 μ L (Input) 分成三份,Input样品-80 $^{\circ}$ C保存备用。

4.1.2 动物组织

- ① 准备405 μ L Complete RIP Lysis Buffer (400 μ L RIP Lysis Buffer+4 μ L Protease Inhibitor (100X)+1 μ L RNase Inhibitor);
- ② 研磨:取新鲜组织或低温组织(约0.3g),置于灭菌后预冷的研钵中,加入液氮快速研磨至粉末状,收集约1/4的样品预留用于后续input组的RNA提取及纯化(使用无核酸酶的EP管存放,-80 $^{\circ}$ C保存);
- ③ 向研钵剩余样品中加入250 μ L Complete RIP Lysis Buffer,在冰上继续研磨5-10min至样品成细腻的匀浆状,转移至新的EP管中,再向研钵中加入剩余的150 μ L Complete RIP Lysis Buffer收集残留的样品,同样转移至该EP管;
- ④ 装有样品匀浆的EP管在冰上充分裂解30min,每5min涡旋一次,10s/次,裂解完成后用细胞超声破碎仪冰浴超声8-10min,20%功率,超声3s,间歇3s。
- ⑤ 4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心10min,收集上清,再向上清中加入RIP Lysis Buffer补充体积至400 μ L,混匀,并按照150 μ L (IP)、150 μ L (IgG)、100 μ L (Input)分成三份,Input样品-80 $^{\circ}$ C保存备用。

4.2 准备磁珠

- ① 准备2支1.5mL EP管,分别标记IgG管和IP管,将ProteinA/G Magnetic Beads原管上下颠倒10次,待磁珠和液体混匀后,分别取出30 μ L到IgG管和IP管;
- ② 每管加入300 μ L RIP Wash Buffer,用移液枪吹打混匀5次,置于磁力架上静置1min,弃上清,该步骤操作3次;
- ③ 用300 μ L的RIP Wash Buffer重悬磁珠。

4.3 磁珠结合抗体

- ① IP管加入3-5ug目的抗体, IgG管加入3-5ug目的抗体相同宿主的IgG, 放到静音混合器上室温孵育2h;
- ② 将两管放到磁力架上静置1min, 弃上清;
- ③ 加入300μL RIP Wash Buffer, 用移液枪吹打混匀5次, 在磁力架上静置1min, 弃上清, 该步骤操作3次。

4.4 RNA结合蛋白免疫沉淀

- ① 准备1.8mL RIP Buffer (1720μL RIP Wash Buffer+70μL 0.5 M EDTA+10μL RNase Inhibitor);
- ② 向步骤4.3所得的IgG管和IP管中分别加入900μL RIP Buffer, 150μL步骤4.1所得 Lysis, 放到静音混合器上, 4°C孵育过夜;
- ③ 将两管放到磁力架上静置1min, 弃上清;
- ④ 将两管各加入300μL RIP Wash Buffer, 用移液枪吹打混匀5次, 在磁力架上静置1min, 弃上清, 该步骤操作5次;
- ⑤ 将两管各加入300μL RIP Wash Buffer, 用移液枪吹打混匀5次, 取100μL混合液到新管, 标记为①管, 剩余液体记为②管, 将4管置于磁力架上静置1min, 弃上清, ①管加100μL Elution Buffer, 煮沸10min后磁力架上静置1min, 取上清到新管, 加入10μL 6X Loading buffer混匀准备WB检测, ②管用于纯化RNA, 分组设置见下表:

组别	RIP Wash Buffer	命名	体积	用途
IgG	300μL	IgG-①	100μL	WB
		IgG-②	200μL	RNA纯化
IP	300μL	IP-①	100μL	WB
		IP-②	200μL	RNA纯化

4.5 RNA纯化

- ① 步骤4.1预留的input样品和 IgG-②管、IP-②管各加入500μL的Trizol，涡旋混匀，室温静置5min，再加入100μL的氯仿，涡旋混匀，4℃ 14,000rpm离心10min，取上层水相（约300μL）到新管，做好标记；
- ② 加入50μL Salt Solution，550μL异丙醇混匀，-80℃静置2-4h（亦可静置过夜），使用前放置4℃解冻；
- ③ 4℃ 14,000rpm离心10min，弃上清；
- ④ 加入500μL 75%乙醇，4℃ 14000rpm离心10min，小心弃掉上清，该步骤操作3次；
- ⑤ 开盖室温晾干，加10-20μL DEPC H₂O，移液枪吹打，使RNA完全溶解，-80℃保存备用。

4.6 RIP-qPCR(选做)

- ① 逆转录：按照逆转录试剂盒进行操作
- ② 反应程序：将Input，IP，IgG逆转录后cDNA分别取1μL加入到PCR反应孔中，每个样品三复孔，其余组分按照SYBR Green qPCR Mix 说明书进行添加，加完后做好标记瞬时离心10s，放入荧光定量PCR仪中上机检测。详细点样方式如下（阳性样本只做GAPDH引物确认是否富集即可）：

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Primer1	B	Input	Input	Input	IgG	IgG	IgG	IP	IP	IP
Primer2	C	Input	Input	Input	IgG	IgG	IgG	IP	IP	IP
...	...	Input	Input	Input	IgG	IgG	IgG	IP	IP	IP

- ③ 结果计算： $\text{Fold Enrichment} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ （以IgG为参照）

4.7 RIP-seq(选做)

取适量Input和IP样本，按照RNA建库试剂盒说明书进行操作。

5. 常见问题

Q1: 如何判断RIP实验成功?

RIP后WB检测IP组和input组检测到目的蛋白信号即判断RIP实验成功。

Q2: IP和IgG样本Ct值没有差异

多方面原因造成:1.抗体没有富集到RNA,可更换抗体尝试;2.IgG背景过高,可增加洗涤次数或减少免疫沉淀步骤RNA投入量。

Q3: 溶解曲线异常

出现非特异扩增或有引物二聚体等情况,需重新设计引物。

Q4: 拉下样本RNA浓度过低

1.样本投入量过少,考虑增加样本初始投入量;2.裂解不完全,组织样本未研磨充分,或者用强裂解液进行裂解。



武汉金开瑞生物工程有限公司

WUHAN GENE CREATE BIOLOGICAL ENGINEERING CO., LTD.

地址：武汉市东湖新技术开发区高新大道666号生物城创新园B4栋二楼

电话：027-87960366

邮箱：marketing@genecreate.com

网址：www.genecreate.cn

