



RNA Binding Protein Immunoprecipitation (RIP)Kit

Catalog# JKR23003-V2.0-6T

Instruction Manual (For Two Groups)

Sufficient reagents for 6 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。

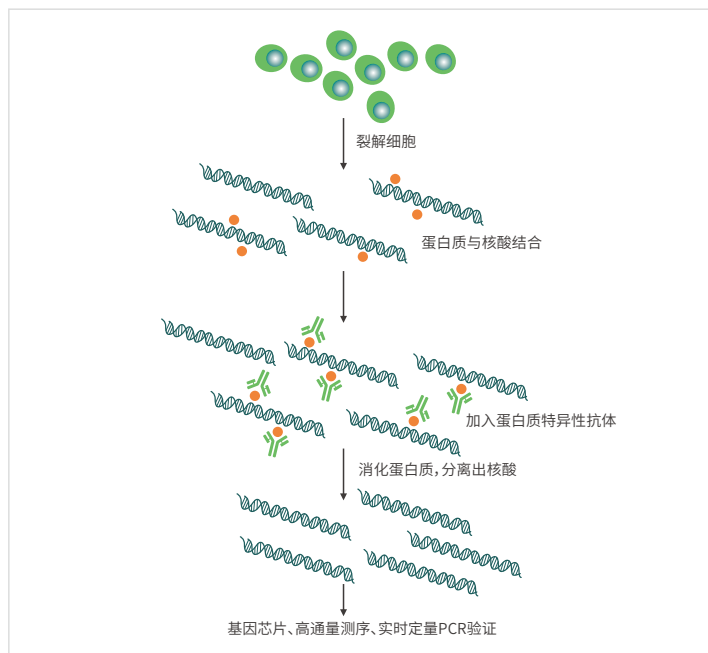
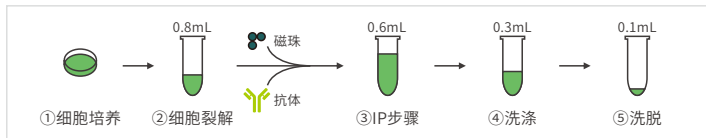


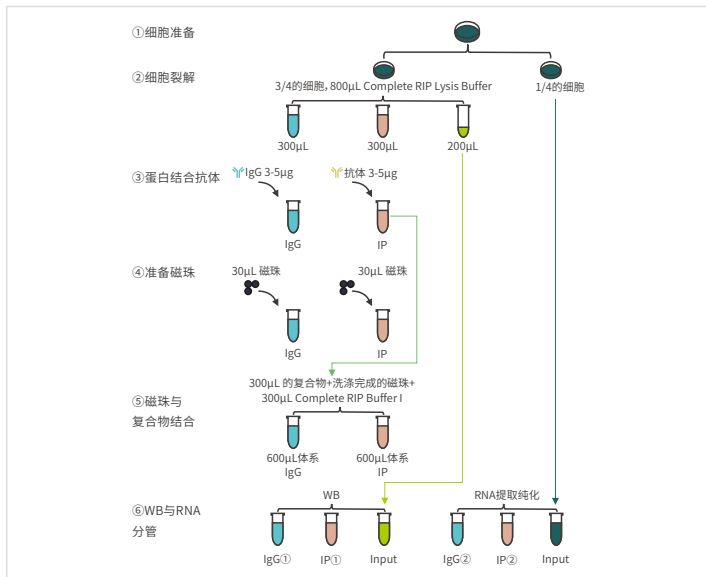
图1.1实验原理图

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 (6T)	保存温度
Protease Inhibitor (100X)	25 μ L	-20°C
RNase Inhibitor	45 μ L	-20°C
Normal Rabbit IgG (1mg/mL)	20 μ L	-20°C
Normal Mouse IgG (1mg/mL)	20 μ L	-20°C
DTT	800 μ L	-20°C
Glycogen	35 μ L	-20°C
RIP Lysis Buffer	6mL	4°C
ProteinA/G Magnetic Beads	200 μ L	4°C
RIP Wash Buffer	50mL	4°C
0.5 M EDTA	400 μ L	4°C
Salt Solution I	350 μ L	4°C
Salt Solution II	105 μ L	4°C
DEPC H ₂ O	400 μ L	4°C
Elution Buffer	800 μ L	4°C避光

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

特别提示2: 6T为6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0.8mL Complete RIP Lysis Buffer (744 μ L RIP Lysis Buffer+40 μ L DTT+8 μ L Protease Inhibitor(100X)+8 μ L 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0.8mL Complete RIP Lysis Buffer重悬,并用移液枪吹打混匀,使细胞充分裂解,冰浴30min,每5min涡旋一次,10s/次,4℃ 12000rpm离心10min,取上清,记为Lysis,并按照300μL(IP)、300μL(IgG)、200μL(Input)分成三份,Input样品-80℃保存备用。(注:若样本较为粘稠或者易结团,可以在裂解完成后用超声波细胞破碎仪冰浴超声2-5min,20%的功率,超声3s,间歇3s)

4.1.2 动物组织

- ① 准备0.8mL Complete RIP Lysis Buffer (744μL RIP Lysis Buffer+40μL DTT+8μL Protease Inhibitor(100X)+8μL 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℃保存);
- ③ 向研钵剩余样品中加入500μL 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300μL 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30-45min,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5-10min,20%功率,超声3s,间歇3s。
- ⑤ 4℃,12000rpm离心10min,收集上清,再向上清中加入RIP Lysis Buffer补充体积至0.8mL,混匀,并按照300μL(IP)、300μL(IgG)、200μL(Input)分成三份,Input样品-80℃保存备用。

4.2 蛋白结合抗体

- ① 取步骤4.1所得Lysis,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4℃孵育过夜(约16h)。

4.3 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原管上下颠倒使磁珠和液体混匀;混匀后分别取出30μL到IgG管和IP管;



- ② 置于磁力架上静置1min, 弃去保护液;
- ③ 加入300 μ L RIP Wash Buffer 用移液枪轻柔混匀, 置于磁力架上静置1min, 弃上清, 该步骤操作3次;

4.4 磁珠与复合物结合

- ① 准备0.6mL Complete RIP Buffer I (570 μ L RIP Wash Buffer+24 μ L 0.5M EDTA+6 μ L RNase Inhibitor);
- ② 将2组孵育后的混合液分别加入到对应洗涤完的磁珠管中, 并各加入300 μ L Complete RIP Buffer I后在静音混合器上室温孵育2h;
- ③ 准备2mL Complete RIP Buffer II (1.9mL RIP Wash Buffer+100 μ L DTT)
- ④ 将2管孵育完成的样品放到磁力架上静置1min, 弃上清;
- ⑤ 将2管各加入300 μ L Complete RIP Buffer II, 在静音混合器上洗涤2-5min, 在磁力架上静置1min, 弃上清, 该步骤操作3次;
- ⑥ 将2管各加入300 μ L RIP Wash Buffer, 用移液枪轻柔混匀后, 取100 μ L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100 μ L Elution Buffer, 煮沸10min后磁力架上静置1min, 取上清到新管, 加入10 μ L 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	300 μ L	IgG-①	100 μ L	WB
		IgG-②	200 μ L	RNA纯化
IP	300 μ L	IP-①	100 μ L	WB
		IP-②	200 μ L	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℃ 14000rpm离心10min，取上层水相（约300μL）到新管，做好标记；
- ② 加入5μL Glycogen，50μL Salt Solution I，15μL Salt Solution II 和850μL无水乙醇，混匀后-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1mL预冷的75%乙醇，涡旋混匀后4℃ 14000rpm离心10min，小心弃掉上清；
- 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 GENECREATE BIOLOGICAL ENGINEERING CO., LTD.

地址：湖北省武汉市江夏区神墩五路北武汉生之源股份生物科创产业园

电话：027-87960366

邮箱：marketing@genecreate.com

网址：www.genecreate.cn

