



# **RNA Binding Protein Immunoprecipitation (RIP)Kit**

**Catalog# JKR23003**

**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。

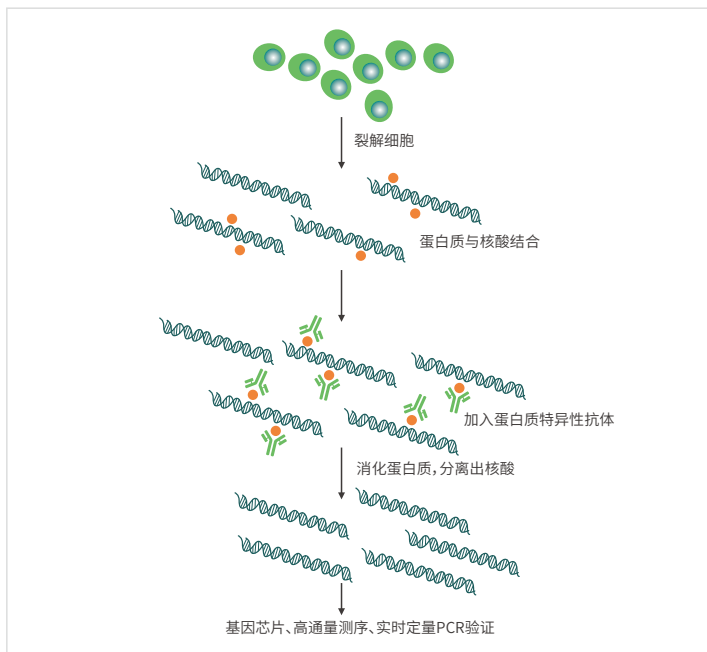
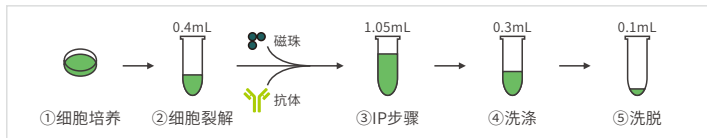


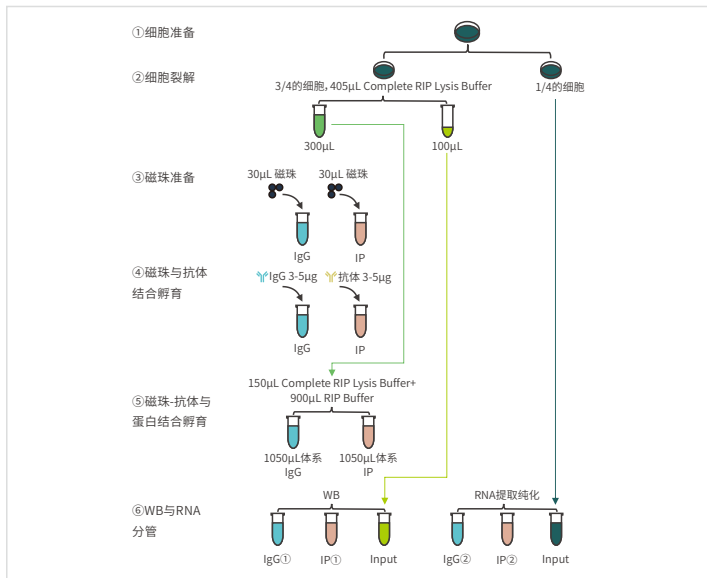
图1.1实验原理图

## 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
RIP Lysis Buffer	3.6mL	4°C
Protease Inhibitor (100X)	15μL	-20°C
RNase Inhibitor	35μL	-20°C
ProteinA/G Magnetic Beads	200μL	4°C
Normal Rabbit IgG (1mg/mL)	30μL	-20°C
Normal Mouse IgG (1mg/mL)	30μL	-20°C
RIP Wash Buffer	50mL	4°C
0.5 M EDTA	400μL	4°C
Salt Solution	600μL	4°C
DEPC H <sub>2</sub> O	400μL	4°C
Elution Buffer	800μL	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: 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405μL Complete RIP Lysis Buffer (400μL RIP Lysis Buffer+4μL Protease Inhibitor (100X)+1μL RNase Inhibitor);
- ② 收集 $2 \times 10^7$ 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 $\mu$ 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。 $4^{\circ}\text{C}$  12000rpm离心10min,取上清,记为Lysis,并按照150 $\mu$ L (IP)、150 $\mu$ L (IgG)、100 $\mu$ L (Input)分成三份,Input样品- $80^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

#### 4.1.2 动物组织

- ① 准备405 $\mu$ L Complete RIP Lysis Buffer (400 $\mu$ L RIP Lysis Buffer+4 $\mu$ L Protease Inhibitor (100X)+1 $\mu$ 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,- $80^{\circ}\text{C}$ 保存);
- ③ 向研钵剩余样品中加入250 $\mu$ 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 $\mu$ 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  $4^{\circ}\text{C}$ ,12000rpm离心10min,收集上清,再向上清中加入RIP Lysis Buffer补充体积至400 $\mu$ L,混匀,并按照150 $\mu$ L (IP)、150 $\mu$ L (IgG)、100 $\mu$ L (Input)分成三份,Input样品- $80^{\circ}\text{C}$ 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 $\mu$ L到IgG管和IP管;
- ② 每管加入300 $\mu$ 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 $\mu$ 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500 $\mu$ L的Trizol, 涡旋混匀, 室温静置5min, 再加入100 $\mu$ L的氯仿, 涡旋混匀, 4 $^{\circ}$ C 14,000rpm离心10min, 取上层水相(约300 $\mu$ L)到新管, 做好标记;
- ② 加入50 $\mu$ L Salt Solution, 550 $\mu$ L异丙醇混匀, -80 $^{\circ}$ C静置2-4h(亦可静置过夜), 使用前放置4 $^{\circ}$ C解冻;
- ③ 4 $^{\circ}$ C 14,000rpm离心10min, 弃上清;
- ④ 加入500 $\mu$ L 75%乙醇, 4 $^{\circ}$ C 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10-20 $\mu$ L DEPC H<sub>2</sub>O, 移液枪吹打, 使RNA完全溶解, -80 $^{\circ}$ C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1 $\mu$ L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: 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](mailto:marketing@genecreate.com)

网址：[www.genecreate.cn](http://www.genecreate.cn)

