

RIP 阳性试剂盒说明书

产品货号: KT102-02

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 (6 个目的抗体组和 6 个阴性 IgG 组)

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
阳性对照体系: (-20℃保存)		
阴性对照抗体 IgG	SCR-10	20uL
阳性对照组抗体 U1C	SCR-11	20uL
阳性 q-pcr 检测引物 U1 mix	SCR-12	100uL (10uM)

需要的额外材料:

旋转仪

逆转录试剂

Q-pcr 试剂

糖原 (可用碧云天糖原)

阳性对照体系说明:

阴阳性对照组抗体 (包含阳性对照抗体 U1C, 阴性对照抗体 IgG), -20℃储存

阳性 q-pcr 检测引物 U1:

FOR: 5' -GGGAGATACCATGATCAGGAAGGT-3'

REV: 5' -CCACAAATTATGCAGTCGAGTTTCCC-3'

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 2×10^7 个

- 1 用细胞刮将细胞刮下来，收集至无 RNA 酶 EP 管。
- 2 1500rpm，4℃离心 5min，弃上清，收集细胞，用 PBS 溶液（每 mL 加入 12uLPMSF, 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℃冰箱翻转裂解 1-2h。
- 4 4℃，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℃

B、磁珠的准备

- 1 上下轻微颠倒重悬磁珠；
- 2 标记实验所需的无 RNA 酶 1.5mL EP 管，包括 input 组，阳性对照抗体 U1C 组，阴性对照抗体 IgG 组。
- 3 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 组不用加磁珠和抗体）；
- 4 每管加入 500uL RIP Buffer，轻微上下颠倒混匀清洗磁珠，；
- 5 3000rpm 离心 1 min，去上清，重复清洗磁珠 1 次，去上清；
- 6 用 500uL 的 RIP Buffer 重悬磁珠，分别加入 3uL 抗体（2-5ug）于相应 EP 管中；
- 7 封口膜封口后，置于 4℃冰箱翻转孵育 6-8 小时。

C、RNA 结合蛋白免疫沉淀

- 1 将 4℃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，然后依次加入表 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℃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）；

电话：020-85625352

邮箱：servers@gzscbio.com

网址：www.gzscbio.com

地址：广州市黄埔区广州国际企业孵化器 B 座 402

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 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;

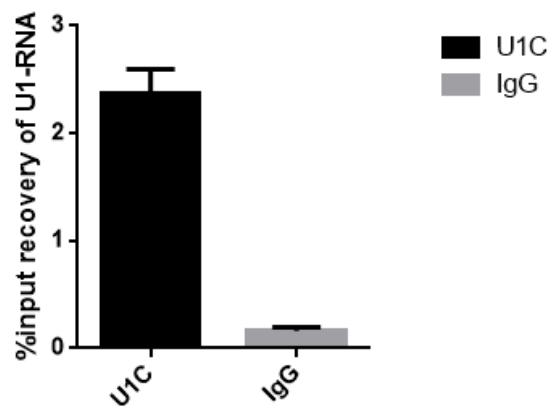
2 再加入 100 μ L 氯仿, 涡旋振荡 10s, 在 4℃, 12000rpm 离心 15min 后小心吸取上层水相至新的离心管中;

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 H₂O 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。

阳性体系 Q-PCR 检测:

Q-pcr 检测蛋白 U1C 与 U1 RNA 是否结合, 用抗体与细胞裂解物孵育能富集 U1 RNA; 用 IgG 孵育不会富集 U1 RNA (图 2)。



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
	确认抗体可以通过 IP 免疫沉淀感兴趣的 RBP
SNRNP70 和 IgG IP 的 PCR 产物之间的数量没有差异	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, 其中可以测量起始 DNA 的量之间的差异。