

RIP 试剂盒说明书

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	200uL
蛋白 G/A 磁珠	SCR-5	650uL
-20℃保存试剂		
蛋白酶抑制剂	SCR-6	200uL
RNase Inhibitor	SCR-7	65uL
ProteinaseK	SCR-8	300uL
阳性对照体系: (-20℃保存)		
阴阳性对照组抗体 srNP70	SCR-9	20uL
阴性对照抗体 IgG	SCR-10	20uL
阳性 q-pcr 检测引物 U1	SCR-11	50uL (10uM)

阳性对照体系说明:

阴阳性对照组抗体 (millipore 03-103, 包含阳性对照抗体 srNP70, 20uL, 阴性对照抗体 IgG, 20uL), -20℃储存

阳性 q-pcr 检测引物 U1:

FOR: 5' -GGGAGATACCATGATCACGAAGGT-3'

REV: 5' -CCACAAATTATGCAGTCGAGTTTCCC-3'

实验过程摘要:

如图 1 所示, RIP 使用体外转录法标记生物素 RNA 探针, 首先将抗体探针与链亲和素标记的磁珠结合形成抗体-磁珠复合物, 然后与胞浆提取液孵育, 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

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

需要的额外材料:

目的抗体
旋转仪
逆转录试剂
Q-pcr 试剂

实验步骤

A、裂解细胞

细胞量: 约 4×10^7 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 溶液清洗细胞 1-2 次
- 5 加入 1mL Cell lysis buffer, 使用前每 mL 裂解液加入 10uL protease inhibitor、10uL Phosphatase inhibitor、12uL PMSF, 吹打均匀后于 4°C 冰箱翻转裂解 1-2h。
- 6 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

- 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, 包括阳性对照抗体 srNP70 组, 阴性对照抗体 IgG 组, 目的抗体组,
- 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;
- 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 2 次, 去上清;
- 6 用 500uL 的 RIP Buffer 重悬磁珠, 加入 5uL 抗体于相应 EP 管中;
- 7 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, 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

1 于每组（包括 input 组）中分别加入 117uL RIP buffer, 15uL 10%SDS, 18uL ProteinaseK 于 65℃ 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，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）；

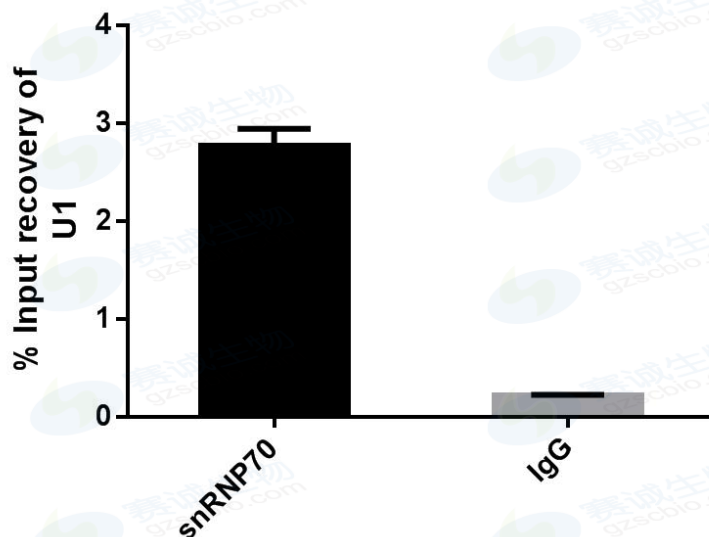
4 加入 3 倍体积无水乙醇和 2uL 糖原，然后于 -20℃ 沉淀过夜；

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 10uL 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。

阳性体系 Q-PCR 检测：

Q-pcr 检测蛋白 srNP70 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。