

RNA Binding Protein Immunoprecipitation(RIP) Kit

RIP 试剂盒说明书

KT102-01 系列：不带阳性对照体系

Cat.No. KT102-0101 (12 rxns)

Cat.No. KT102-0102 (24 rxns)

Cat.No. KT102-0103 (48 rxns)

KT102-02 系列：包含阳性对照体系

Cat.No. KT102-0201 (12 rxns)

Cat.No. KT102-0202 (24 rxns)

Cat.No. KT102-0203 (48 rxns)

按试剂标签提示分开储存

For research use only, not intended for diagnostic testing.

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。

试剂盒包装组分:

表 1 KT102-01 试剂盒包装组分信息

室温保存试剂				
编号	试剂	数量(12 rxns)	数量(24 rxns)	数量(48 rxns)
SCR-1	Cell lysis buffer	10mL	20mL	40mL
SCR-2	RIP buffer	125mL	250mL	500mL
SCR-3	0.5M EDTA	500uL	1mL	2mL
SCR-4	10%SDS	300uL	600uL	1200uL
4℃保存试剂				
SCR-5	proteinA/G 磁珠	650uL	1.3mL	2.6mL
SCR-6	ProteinaseK	250uL	500uL	1mL
-20℃保存试剂				
SCR-7	蛋白酶抑制剂	150uL	300uL	600uL
SCR-8	PMSF	150uL	300uL	600uL
SCR-9	RNase Inhibitor	65uL	130uL	260uL
SCR-10	阴性抗体 IgG	35uL	70uL	140uL

表 2 KT102-02 阳性试剂盒包装组分信息

室温保存试剂				
编号	试剂	数量(12 rxns)	数量(24 rxns)	数量(48 rxns)
SCR-1	Cell lysis buffer	10mL	20mL	40mL
SCR-2	RIP buffer	125mL	250mL	500mL
SCR-3	0.5M EDTA	500uL	1mL	2mL
SCR-4	10%SDS	300uL	600uL	1200uL
4℃保存试剂				
SCR-5	proteinA/G 磁珠	650uL	1.3mL	2.6mL
SCR-6	ProteinaseK	250uL	500uL	1mL
-20℃保存试剂				
SCR-7	蛋白酶抑制剂	150uL	300uL	600uL
SCR-8	PMSF	150uL	300uL	600uL
SCR-9	RNase Inhibitor	65uL	130uL	260uL
阳性对照体系: (-20℃保存)				

SCR-10	阴性抗体 IgG	30uL	60uL	120uL
SCR-11	阳性对照组抗体 U1C	30uL	60uL	120uL
SCR-12	阳性 q-pcr 检测引物 U1 mix	25uL (10uM)	50uL (10uM)	100uL (10uM)

注：对照组与实验组消耗试剂量相同，一次 ChIP 实验含 Input 组、目的抗体组（或者阳性抗体组）、阴性抗体组，要消耗 2 rxns 试剂量。

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），适用于大多数哺乳动物细胞和组织。

阳性 q-pcr 检测引物 U1:

FOR: 5' -GGGAGATACCATGATCACGAAGGT-3'

REV: 5' -CCACAAATTATGCAGTCGAGTTTCCC-3'

实验前准备

细胞准备

A 动物组织处理：

细胞量：约 $1-2 \times 10^7$ 个

动物组织经过组织匀浆或液氮研磨后，去除大颗粒组织后用 PBS 重悬细胞，清洗 2-3 次，3000rpm 离心 3min，去除上清后-80℃ 保存或继续进行实验。

注：尽量将上清液彻底吸干再保存。

B 动悬浮细胞交联：

细胞量：约 $1-2 \times 10^7$ 个

悬浮细胞培养之后连同培养液收集到离心管中，3000rpm 离心收集细胞沉淀；细胞沉淀用 PBS 重悬再离心去上清，重复清洗细胞 3 次，去除上清后-80℃ 保存或继续进行实验。

注：尽量将上清液彻底吸干再保存。

C 贴壁细胞交联：

细胞量：约 $1-2 \times 10^7$ 个

贴壁细胞培养好后，用胰酶消化或者细胞刮刮下转移到离心管中，3000rpm 离心收集细胞沉淀；细胞沉淀用 PBS 重悬再离心去上清，重复清洗细胞 3 次，去除上清后-80℃ 保存或继续进行实验。

注：尽量将上清液彻底吸干再保存。

需要的额外材料:

试剂:

目的抗体

PBS 溶液

RNA 提取试剂: trizol 或酚氯仿异戊醇提取液

逆转录试剂

q-pcr 检测试剂

糖原 (可用碧云天糖原)

仪器设备:

旋转仪

低温高速离心机

Q-pcr 仪

实验过程摘要:

如图 1 所示, 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

RIP 实验步骤

注：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

A、裂解细胞

细胞量：约 $1-2 \times 10^7$ 个

1. 将细胞从 -80°C 中取出，加入 1mL 预冷的 Cell lysis buffer (SCR-1)，使用前每 mL 裂解液加入 12uLPMSF (SCR-8)，10uL 蛋白酶抑制剂 (SCR-7)，吹打均匀后于 4°C 冰箱翻转裂解 1-2h。

注：一次 IP 实验包括 input、阳性对照抗体（或目的抗体）、阴性抗体组只需要一份 1mL 细胞裂解液。如果同时做目的抗体和阳性对照，只需做一个 IgG 阴性对照。

2. 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

注：操作过程中不要剧烈吹打磁珠，控制孵育时间和清洗条件，磁珠不用冷冻或者干裂

1. 上下轻微颠倒重悬磁珠 (SCR-5)；

2. 标记实验所需的无 RNA 酶 1.5ml EP 管，包括 input 组，目的抗体组，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，3000rpm 离心 1 min，去上清 (input 组不加磁珠和抗体)；

4. 每管加入 500uL RIP Buffer (SCR-2)，轻微上下颠倒混匀清洗磁珠，3000rpm 离心 1 min，去上清，重复清洗磁珠 2 次，去上清；

5. 用 500uL 的 RIP Buffer (SCR-2) 重悬磁珠，分别加入 5uL 阴性 IgG 抗体 (SCR-10)、5uL 阳性抗体 (SCR-11) 或目的抗体 5ug (自备) 于相应 EP 管中；

注：目的抗体进行 IP 前建议先进行 WB 检测，确认抗体是否失效以及目的蛋白的表达情况。

6. 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 (SCR-2) 清洗磁珠 1 次，去除上清后依次加入表 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 (SCR-2)	860uL
RNase Inhibitor (SCR-9)	5uL
0.5M EDTA (SCR-3)	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 作为 **input 组** 于另一 EP 管中。

注：input 组一般取 IP 组裂解液用量的 10% 用来提取 RNA 即可。

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 (SCR-2)，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；

注：如果需要进行 WB 验证抗体对靶标蛋白的捕获，可以将磁珠分 1/3 至另一管中，加入 SDS loading buffer 100℃ 煮 5-10min 洗脱蛋白取上清进行 WB 验证。

D、RNA 纯化

方法 1 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 (SCR-2)，15uL 10%SDS (SCR-4)，18uL ProteinaseK (SCR-6) 于 55℃ 孵育 1h；

2. 3000rpm 离心 5min，目的抗体组和阴性对照组取上清至新的无 RNA 酶 EP 管中，标识清楚，加入 250uL RIP buffer (SCR-2)，input 组直接加 250uL RIP buffer (SCR-2)；
（为了使体积增大以便后续吸取水相，减少 RNA 损失）

3. 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）；

4. 4℃ 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）；

注：在抽提 RNA 过程中，要小心吸取上清，避免吸到下层有机相

5. 加入 3 倍体积无水乙醇然后于 -20℃ 沉淀过夜或 -80℃ 沉淀 1h 以上；

注：可以选择加入 1-2uL 糖原帮助 RNA 沉淀。

6. 4℃, 12000rpm 离心 15-30min，小心去上清；

7. 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。

注：乙醇沉淀 RNA 后要小心移除上清，防止 RNA 丢失

方法2 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 $^{\circ}$ C，12000rpm 离心 15min 后小心吸取上层水相至新的离心管中；

注：在抽提 RNA 过程中，要小心吸取上清，避免吸到下层有机相

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 $^{\circ}$ C 沉淀过夜。

4 第二天取出在 4 $^{\circ}$ C，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 $^{\circ}$ C 保存。纯化的 RNA 产物可用于后续的 Q-PCR 检测或测序。

注：乙醇沉淀 RNA 后要小心移除上清，防止 RNA 丢失

q-pcr 检测注意事项:

1. 为了保证单一变量，input 组、阳性抗体组、IgG 组获得的 RNA 产物最终用相同体积的水溶解，并且在逆转录过程中用相同体积 RNA 进行逆转录，不要测浓度之后把产物浓度调平。

2. input 组一般是取 10% 的量提取的 RNA，q-pcr 的到的 Ct 值是 1/10 底物的数据，计算时 Ct 要减去 3.3。

3. Q-pcr 结果计算示例:

$$\Delta Ct [\text{normalized IP}] = (Ct [\text{IP}] - (Ct [\text{Input}] - \log_2 (\text{Input Dilution Factor})))$$

$$\% \text{ Input} = 2^{-\Delta Ct [\text{normalized IP}]} * 100\%$$

我们的 input 通常去总量的 1/10，即稀释了 10 倍， $\log_2 (\text{Input Dilution Factor}) \approx 3.3$

计算示例:

	input	UIC
U1	14.05	17.55

$$\Delta Ct = 17.55 - (14.05 - 3.3) = 6.8 \quad \% \text{ input} = 2^{-6.8} * 100\% = 0.9\%$$

阴性对照组与目的组计算方法一样，最后比较目的组和阴性对照组的相对捕获量。

高通量测序注意事项:

1. 高通量测序一般测 input 组和 target 组的 RNA 产物，input 归一化处理作为 target 组捕获 RNA 的基准线；

2. 文库构建可以使用进口的 KAPA 或者国产诺唯赞的 DNA 建库试剂盒，相关试剂盒信息如下：

KAPA Stranded RNA-Seq Library Preparation Kit (kk8400)

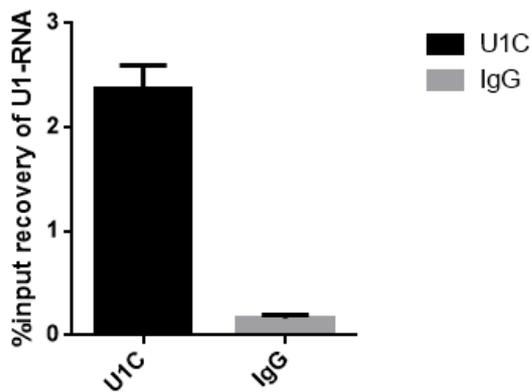
VAHTS[®] Universal V8 RNA-seq Library Prep Kit for Illumina (NR605)

3. 赛诚生物提供RNA建库、高通量测序及生信分析全套服务，如有需要，欢迎咨询。

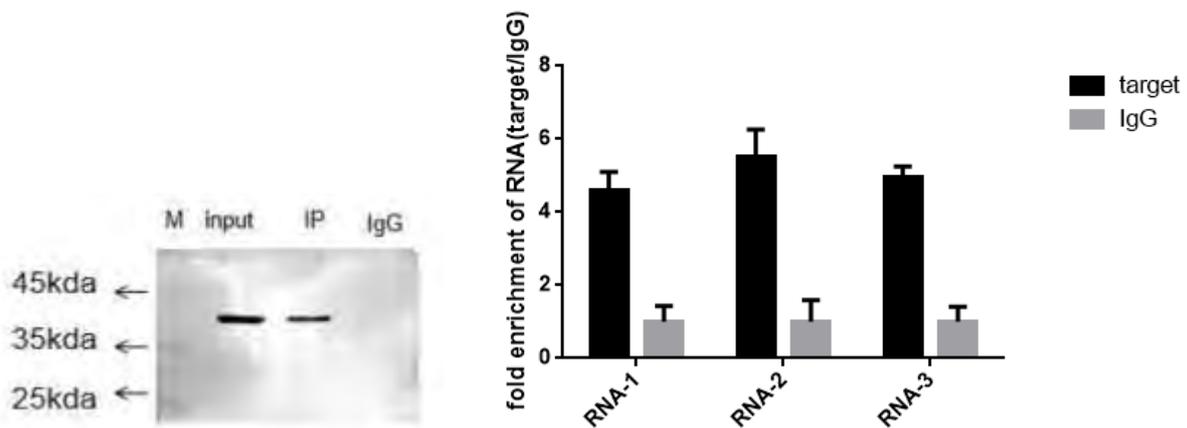
结果展示:

阳性体系Q-PCR检测示例:

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。U1C 抗体组与 IgG 组结合 U1-RNA 差异在 2 个 Ct 值以上。



RIP-qPCR实验案例:



该 RIP 使用蛋白 A 抗体进行 IP 后，获取与蛋白 A 结合的 RNA，并进行 q-pcr 检测下游靶标 RNA。首先取一部分 IP 后的磁珠提蛋白进行 WB 检测抗体对靶标蛋白的捕获，结果显示，与 IgG 组相比 A 抗体能捕获到靶标蛋白 A。通过信息学预测得到 3 个可能与靶蛋白 A 结合的 RNA，然后通过 RIP-qpcr 检测，结果表明位 3 个 RNA 都与靶蛋白 A 结合。

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
UIC 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，可以测量起始 DNA 的量之间的差异。