天净沙系列

CAT#：260114

常温运输和保存

RNA 结合蛋白免疫沉淀试剂盒

RNA Binding Protein Immunoprecipitation Kit

使用手册 V0.8

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品特点

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 qPCR 验证或者高通量测序分析。本产品仅用于科研。

规格及成分

本产品使用大纸盒包装

成分	编号	规格	包装
RIP 裂解缓冲液	260114a	2.4 mL	5 mL 本色瓶
100×蛋白酶抑制剂	260114b1	15 μL	0.5 mL 本色管
RNA 酶抑制剂	260114b2	35 μL	0.5 mL 本色管
蛋白 A/G 磁珠	260114b3	200 μL	0.5 mL 本色管
1 mg/mL 正常兔免疫球蛋白 G	260114b4	30 μL	0.5 mL 红盖管
1 mg/mL 正常鼠免疫球蛋白 G	260114b5	30 μL	0.5 mL 本色管
RIP 洗涤缓冲液	260114b6	50 μL	0.5 mL 绿盖管
0.5 M EDTA	260114b7	400 μL	0.5 mL 本色管
盐溶液	260114b8	600 μL	0.5 mL 本色管
DEPC 水	260114b9	400 μL	0.5 mL 本色管
洗脱缓冲液	260114b10	800 μL	0.5 mL 本色管
使用手册	260114sc	1 份	无

运输及保存

常温运输和保存，有效期一年。

自备试剂

去离子水、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、0.22 μm 注射器式滤膜

使用方法

一、样本前处理

1.1 动物细胞

(1) 准备 405 μL 完全 RIP 裂解缓冲液 (400 μL RIP 裂解缓冲液+4 μL 100×蛋白酶抑制剂+1 μL RNA 酶抑制剂)。

(2) 收集 2×E7 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。

(3) 向剩余细胞沉淀中加入 400 μL 完全 RIP 裂解缓冲液重悬，并用移液枪吹打混匀 10 次，使细胞充分裂解，冰浴 30 min，每 10 min 涡旋一次，10 s/次，4℃ 12000 rpm 离心 10 min，取上清，记为裂解产物，并按照 150 μL（IP）、150 μL（IgG）、100 μL（input）分成三份，input 样本-80℃保存备用。

1.2 动物组织

(4) 准备 405 μL 完全 RIP 裂解缓冲液 (400 μL RIP 裂解缓冲液+4 μL 100×蛋白酶抑制剂+1 μL RNA 酶抑制剂)

(5) 取新鲜组织或低温组织（约 0.3 g），置于预冷的研钵中，加入液氮进行快速研磨至粉末状，并收集到 2 管无 RNase 的离心管中，1 管约 1/4 的组织样品预留用于后续 input 组的 RNA 提取及纯化。

(6) 向另一管组织粉末中加入 400 μL 完全 RIP 裂解缓冲液重悬沉淀，用移液枪吹打混匀 10 次，使组织充分裂解，冰浴 30 min，每 10 min 涡旋一次，10 s/次，4℃ 12000 rpm 离心 10 min，取上清，记为裂解产物，并按照 150 μL (IP)、150 μL (IgG)、100 μL (input)分成三份，input 样品-80℃保存备用。

2.磁珠准备

(7) 准备 2 支 1.5 mL EP 管，分别标记 IgG 管和 IP 管，将蛋白 A/G 磁珠原管上下颠倒 10 次，待磁珠和液体混匀后，分别取出 30 μL 到 IgG 管和 IP 管。

(8) 每管加入 300 μL RIP 洗涤缓冲液，用移液枪吹打混匀 5 次，置于磁力架上静置 1 min，弃上清，该步骤操作 3 次。

(9) 用 300 μL 的 RIP 洗涤缓冲液重悬磁珠。

3.磁珠结合抗体

(10) IP 管加入 3-5 μg 目的抗体，IgG 管加入 3-5 μg 目的抗体相同宿主的 IgG，放到静音混合器上室温孵育 60 min。

(11) 将两管放到磁力架上静置 1 min，弃上清。加入 300 μL RIP 洗涤缓冲液，用移液枪吹打混匀 5 次，在磁力架上静置 1 min，弃上清，该步骤操作 3 次。

4.RNA 结合蛋白免疫沉淀

(12) 准备 1.8 mL RIP 缓冲液（1720 μL RIP 洗涤缓冲液+70 μL 0.5 M EDTA+10 μL RNA 酶抑制剂）；向步骤 3 所得的 IgG 管和 IP 管中分别加入 900 μL RIP 缓冲液，150 μL 步骤 1 所得裂解产物，放到静音混合器上，4℃孵育过夜。

(13) 将两管放到磁力架上静置 1 min，弃上清；将两管各加入 300 μL RIP 洗涤缓冲液，用移液枪吹打混匀 5 次，在磁力架上静置 1 min，弃上清，该步骤操作 5 次。

(14) 将两管各加入 300 μL RIP 洗涤缓冲液，用移液枪吹打混匀 5 次，取 100 μL 混合液到新管，标记为 A 管，剩余液体记为 B 管，将 4 管置于磁力架上静置 1 min，弃上清，A 管加 100 μL 洗脱缓冲液，煮沸 10 min 后磁力架上静置 1 min，取上清到新管，加入 10 μL 6×上样缓冲液混匀准备 WB 检测，B 管用于纯化 RNA，分组设置见下表:

实验组	RIP 洗涤缓冲液	样本名称	体积	实验
lgG	300 μL	lgG-A	100 μL	WB 检测
		lgG-B	200 μL	RNA 纯化
IP	300 μL	IP-A	100 μL	RNA 纯化
		IP-B	200 μL	RNA 纯化

5.RNA 纯化

(15) 步骤 1 预留的 input 样品和步骤 4 的 IgG-B 管与 IP-B 管中各加入 500 μL 的 TrizoL，涡旋混匀，室温静置 5 min，再加入 100 μL 的氯仿，涡旋混匀，4℃ 14，000 rpm 离心 10 min，取上层水相（约 300 μL）到新管，做好标记。

(16) 加入 50 μL 盐溶液，550 μL 异丙醇混匀，-80℃静置 2~4 h（亦可静置过夜），使用前放置 4℃解冻。

(17) 4℃ 14，000 rpm 离心 10 min，弃上清，加入 500 μL 75%乙醇，4℃ 14，000 rpm 离心 10 min，小心弃掉上清，该步骤操作 3 次。

(18) 开盖室温晾干，加 10-20 μL DEPC 水，移液枪吹打，使 RNA 完全溶解，-80℃保存备用。

6.RIP-qPCR（选作步骤）

(19) 逆转录：按照逆转录试剂盒进行操作。

(20) 反应程序：将 Input、IP、IgG 逆转录后 cDNA 分别取 1 μL 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 10 s，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
引物 1	B	input	input	input	IgG	IgG	IgG	IP	IP	IP
引物 2	C	input	input	input	IgG	IgG	IgG	IP	IP	IP
…	…	input	input	input	IgG	IgG	IgG	IP	IP	IP

(21) 结果计算：Fold Enrichment=2^(△△Ct)（以 lgG 为参照)

△△Ct=(Ct Ip-Ct input)-(Ct lgc-Ct input)=×(input 组目标基因 Ct input 值作为参照 Ct 值）则目标基因的 IP 组表达水平为 lgG 组的 2 的负 x 次方倍。

关联产品 ChIP 染色质免疫沉淀试剂盒