天净沙系列

CAT#:261016

低温运输，-20℃保存

天净沙

RNA 结合蛋白免疫沉淀试剂盒(Protein A/G 琼脂糖磁珠)

RIP Assay Kit (Protein A/G Magnetic Agarose Beads)

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

产品及特点

本产品是 RNA 结合蛋白免疫沉淀试剂盒(Protein A/G 琼脂糖磁珠)，是一种用于通过免疫沉淀来沉淀和目标蛋白结合的 RNA 片段，最后通过 PCR、qPCR 或 NGS 等方法来检测免疫沉淀所获得的 RNA 片段的试剂盒。通常用于检测特定的 RNA 结合蛋白是否和预期的特定 RNA 在同一复合物中，或检测特定的 RNA 结合蛋白和哪些 RNA 结合。产品特点如下：

1. 方便快捷。与常规的琼脂糖法相比，无需离心，只需要短时间磁性分离即可，可以有效避免因为离心对免疫复合物造成的机械力影响，充分保证免疫复合物的天然状态。
2. 一站式，提供了 RIP 实验所需所有试剂。
3. 本产品用于常规的 RNA 免疫沉淀，共可以免疫沉淀 22 个样品。
4. 本产品仅用于科研。

规格及成分

本产品采用大扁盒包装

成分	编号	规格	包装材料
Protein A/G 琼脂糖磁珠	261016a	700 μL	1.5 mL 蓝盖管
裂解缓冲液	261016b	10 mL	10 mL 本色瓶
NT2 洗涤缓冲液	261016c	250 mL	250 mL 本色瓶
洗脱缓冲液	261016d	3 mL	10 mL 本色瓶
40 U/μL RNase 抑制剂	261016e	30 μL	0.5 mL 红盖管
0.5 M DTT	261016f	20 μL	0.5 mL 黄盖管
100 mM PMSF	261016g	20 μL	0.5 mL 绿盖管
使用手册	261016sc	1份	1份

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期 1 年。其中 Protein A/G 琼脂糖磁珠、裂解缓冲液、NT2 洗涤缓冲液也可以 4℃保存，有效期 1 个月。

自备试剂

RNase-free 水、RNA 纯化试剂盒。

使用方法

使用说明（本使用说明以一次 RIP 反应需要使用 150 万个细胞、所需裂解缓冲液 300 μL 为例）

一、洗涤 Protein A/G 琼脂糖磁珠

1. 用移液器轻轻吹打重悬 Protein A/G 琼脂糖磁珠，按照每 300 μL 样品需 30 μL Protein A/G 琼脂糖磁珠悬浊液，取适量 Protein A/G 琼脂糖磁珠至一洁净离心管中，加入 1 mLNT2 洗涤缓冲液。
2. 用移液器轻轻吹打重悬 Protein A/G 琼脂糖磁珠。置于磁力架上分离 10 秒，去除上清，切勿触及磁珠。共重复洗涤三次。

二、Protein A/G 琼脂糖磁珠与抗体预结合

3. 按照每 30 μL Protein A/G 琼脂糖磁珠悬浊液需 100 μLNT2 洗涤缓冲液的量，取适量 NT2 洗涤缓冲液加入到洗涤后的 Protein A/G 琼脂糖磁珠中，适当重悬。
4. 根据实验设计，加入适量一抗（目的蛋白特异性抗体、阳性对照抗体或阴性对照 IgG），室温孵育 30 分钟或 4°C 摇床孵育 1-4 小时。推荐使用数字式翘板摇床或基础型旋转混匀仪。

   注：高质量的抗体是保证 RIP 实验成功的关键因素，抗体的用量与抗体的纯度和效价、目的蛋白的丰度等有关。

   注：目的蛋白特异性抗体需自备，用量可以参考相应抗体的说明书。如果抗体的说明书中未给出用于 RIP 的稀释比例，可以参考普通的免疫沉淀的稀释比例，通常用量为 1-5 μg。

   注：阴性对照 IgG 加入量应当和目的蛋白特异性抗体加入量保持一致。

三、样品的制备

A、对于贴壁细胞

5. 吸除细胞培养液，PBS 洗涤一次；对于悬浮细胞，离心收集细胞后，PBS 洗涤一次。如需细胞计数，可在平行孔或皿中加入胰酶消化细胞或用细胞刮刮离细胞后进行细胞计数。
6. 一次 RIP 反应按照每 150 万个细胞加入 300 μL 裂解缓冲液的比例加入裂解缓冲液。用移液器吹打数下，使裂解缓冲液和细胞充分接触以有效裂解细胞。

   注：裂解缓冲液中需加入终浓度为 1 mM 的 DTT、100 U/mL 的 RNase 抑制剂和 0.2 mM 的 PMSF。例如配制 1 mL 裂解缓冲液，需同时向裂解缓冲液中加入 2 μL 0.5 M DTT、2.5 μL 40 U/μL RNase 抑制剂和 2 μL100 mM PMSF。
7. 在冰浴上孵育 5-15 分钟，以充分裂解细胞。
8. 充分裂解后（对于贴壁细胞，如有必要可以用细胞刮刮离并收集细胞），4°C、14,000×g 离心 10 分钟，取上清即为制备好的细胞样品裂解液。取出 30 μL（一次 RIP 反应的 10%裂解液）样品作为 Input 用于后续检测。Input 须-80°C 保存。

B、对于组织样品

9. 通常按照 15-30 mg 组织加入 300 μL 裂解缓冲液的比例加入裂解缓冲液，使用高通量组织研磨仪、手持式组织研磨仪或玻璃匀浆器在约 4°C 或冰浴等低温条件下匀浆。将匀浆液在 4°C、14,000×g 离心 10 分钟，取上清即为制备好的组织样品裂解液。取出 30 μL（一次 RIP 反应的 10%裂解液）样品作为 Input 用于后续检测。Input 须-80°C 保存。

注：本步骤加入的裂解缓冲液同前（每 150 万个细胞加 300 μL），也需要在裂解缓冲液中加入终浓度为 1 mM 的 DTT、100 U/mL 的 RNase 抑制剂和 0.2 mM 的 PMSF。

四、免疫沉淀（IP）

10. 步骤二中 Protein A/G 琼脂糖磁珠与抗体预结合后，置于磁力架上分离 10 秒，去除预结合完毕上清，切勿触及磁珠。
11. 取 270 μL 细胞或组织样品裂解液，加入到抗体预结合 Protein A/G 琼脂糖磁珠中，颠倒混匀后，4°C 摇床孵育 4 小时，也可以根据实际情况孵育更长时间或过夜。

    注：根据测试，样品孵育的时间越长，免疫沉淀的效果可能会更好，但也存在 RNA 降解的风险。一般建议 4°C 摇床孵育 4 小时。

    注：也可先将目的蛋白特异性抗体或阴性对照 IgG 与样品 4°C 摇床孵育 4 小时或过夜后，再加入 30 μL Protein A/G 琼脂糖磁珠悬浊液室温孵育 30 分钟。

五、洗脱

12. 置于磁力架上分离 10 秒，去除上清，切勿触及磁珠。
13. 加入 1 mL 的 NT2 洗涤缓冲液，用移液器轻轻吹打重悬 Protein A/G 琼脂糖磁珠，置于磁力架上分离 10 秒，去除上清，切勿触及磁珠。共重复洗涤四次，最后弃上清。
14. 加入 100 μL 洗脱缓冲液，混悬均匀后，55°C 孵育 30 分钟。

六、RNA 纯化

15. 用 RNA 纯化试剂盒进行过柱纯化 RNA。步骤 8 中 Input 组（30 μL）用 RNase-free 水补足体积至 100 μL，与其它样品体积保持一致，同时进行 RNA 纯化。纯化好的 RNA 可以立即进行后续实验或-80℃保存。

    注：本实验对 DNA 残留较敏感，如有必要可以在纯化的过程中添加 DNase I 去除 DNA。

七、RNA 分析或验证

16. 如果 RBP 的结合靶标未知，或者探索新的结合靶标，可以通过高通量测序来检测和分析结合的 RNA。如果已知或有候选的 RBP 的结合 RNA，RNA 的分析可以通过设计特异性引物序列，使用 qRT-PCR 分析验证。
17. 反转录可以酌情使用具有 Oligo(dT)、Random primers 或特定引物。Oligo(dT)适合用于带有 Poly(A)尾的 RNA 的反转录，Random primers 适合用于任何长链 RNA 的反转录，小 RNA 的反转录需要使用专门适合小 RNA 的 qRT-PCR 定量方法。

    注：由于蛋白结合 RNA 的量比较低，一步法的 qRT-PCR 试剂盒的效果可能会欠佳，推荐使用两步法进行 qRT-PCR 检测，即先进行反转录，再进行 qPCR。

18. **qPCR 数据处理，根据 2-ΔCt 和 2-ΔΔCt 公式计算 RIP 中目标 RNA 占 Input 中 RNA**

	的比例（%Input）和目标基因相当于阴性对照的富集倍数(Fold Enrichment)： 1) ΔCt [RIP]=Ct [RIP] – (Ct [Input] – Log_2(Input Dilution Factor)) 2) Input Dilution Factor 为 Input 组稀释倍数，即若最初保留的 Input 为 30 μL（一次 RIP 反应的 10%蛋白裂解液）样品，则稀释倍数为 10。 3) %Input = 2(-ΔCt[RIP]) 4) ΔΔCt [RIP/IgG] = Ct [RIP] – Ct [IgG] 5) RIP Fold enrichment = 2(-ΔΔCt [RIP/IgG])。 19. 举例：经 qPCR 测定，RIP 阳性对照组（HuR）的 Ct 值为 24.1、阴性对照 IgG 组的 Ct 值为 30.0、Input 组的 Ct 值为 19.6，Input 稀释倍数为 10。则： 1) ΔCt [HuR] = Ct [HuR] – (Ct [Input] – Log_2(Input Dilution Factor)) = 24.1 - (19.6 - $Log_2$10) = 7.82 2) % Input (HuR) = 2(-ΔCt[HuR]) = 2 - 7.82 = 0.4% 3) ΔCt [IgG] = Ct [IgG] – (Ct [Input] – Log_2(Input Dilution Factor)) = 30.0 - (19.6 - $Log_2$10) = 13.72 4) % Input (IgG) = 2(-ΔCt[HuR]) = 2-13.72 = 0.0074% 5) ΔΔCt [HuR/IgG] = 24.1-30.0 = -5.9 6) Fold Enrichment of RNA (HuR/IgG) = 2(-ΔΔCt [HuR /IgG]) = 2(-(-5.9)) = 59.7 **注意事项：** 20. 操作过程要严格保证无 RNase 污染。 21. 为确保 RNA 与特异性目标蛋白的结合，RIP 实验中所使用的样本尽量保证为新鲜制备。 22. Protein A/G 琼脂糖磁珠使用前一定要充分重悬，即充分颠倒若干次使混合均匀。 23. 为确保在 RIP 操作中 RNA 和蛋白质不被降解，需在使用说明中的标注之处加入相对应的 RNase 抑制剂和 PMSF。所有步骤尽量在冰上，以降低可能的 RNase 活性。 24. 洗涤 Protein A/G 琼脂糖磁珠时小心吸除上清，切勿触及磁珠，背景较高时，可增加洗涤次数。 25. 用于 RIP 检测的抗体，可先通过 Western 验证抗体是否可以应用于 IP 检测，然后再进行 RIP 实验。 26. 本试剂盒未提供阴性对照抗体 IgG，需要单独订购与特异性目的蛋白抗体相对应种属的 IgG。
关联产品	蛋白质-RNA Pull-Down 试剂盒（生物素-SA 磁珠法）