



PureBinding[®] RNA Immunoprecipitation Kit

Cat.No. P0101 (12 rxns)

Cat.No. P0102 (24 rxns)

Sufficient reagent for RIP assays per kit

按试剂标签提示分开储存

For research use only, not intended for diagnostic testing.



目录

| | |
|-----------------|----|
| 背景介绍 | 1 |
| 应用范围 | 1 |
| 实验原理图 | 1 |
| 试剂盒组分 | 2 |
| 自备材料 | 2 |
| 实验前试剂准备 | 3 |
| 实验操作流程图 | 4 |
| 实验时间管理 | 4 |
| 实验前准备 | 6 |
| 实验操作 | 7 |
| 常见问题及处理方法 | 12 |
| 参考文献 | 13 |



背景介绍

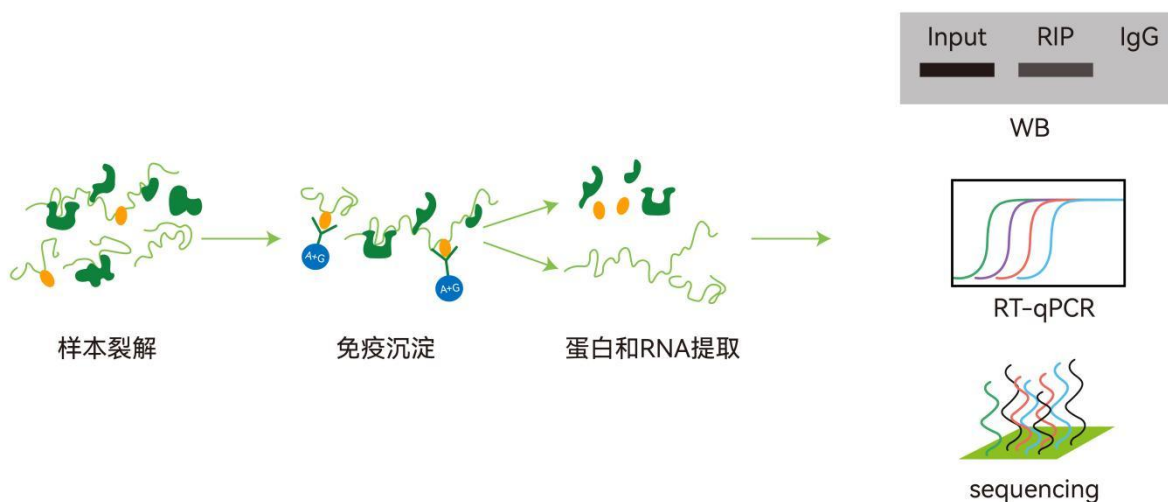
RNA Immunoprecipitation (RIP) 是研究细胞内 RNA 与蛋白结合的技术，是了解转录后调控网络动态过程的有力工具。

RIP 利用特异性抗体对目标蛋白进行捕获，实现目标蛋白-RNA 复合物的富集，再通过对复合物中蛋白和 RNA 的检测和分析，探索分子间相互结合关系。分离复合物中的 RNA，经过逆转录或构建 cDNA 文库，最后利用基因特异性分析技术 (PCR、qRT-PCR) 或高通量分析技术 (高通量测序、基因芯片)，分析复合物中 RNA 的类型及多少；分离复合物中的蛋白，通过 WB 或质谱等方法，还可用于做质控、检测目标蛋白抗体质量以及研究与目标蛋白结合的其他互作蛋白。

应用范围

- 与目标蛋白结合的 RNA 及其他相互作用蛋白分析；
- RBP 结合 RNA motif 鉴定；
- 不适用膜结合蛋白、DNA 结合蛋白（组蛋白、核仁蛋白等）的 RIP 实验。

实验原理图





试剂盒组分

| 编号 | 名称 | 规格 12 rxns | 规格 24 rxns | 保存条件 |
|------|-----------------------------|------------|------------|--------------|
| 【1】 | 10× Buffer A | 10 mL | 20 mL | 2 ~ 8 °C |
| 【2】 | 10× Buffer B | 10 mL | 20 mL | 2 ~ 8 °C |
| 【3】 | 10× Buffer C | 10 mL | 20 mL | 2 ~ 8 °C |
| 【4】 | protein A+G beads | 1 mL*2 | 1 mL*4 | 2 ~ 8 °C |
| 【5】 | Buffer D | 150 μL | 300 μL | 2 ~ 8 °C |
| 【6】 | 蛋白酶抑制剂 | 80 μL | 160 μL | -25 ~ -18 °C |
| 【7】 | RNase 抑制剂 | 80 μL | 160 μL | -25 ~ -18 °C |
| 【8】 | DR Columns | 18 个 | 36 个 | 室温 |
| 【9】 | RC Columns | 18 个 | 36 个 | 室温 |
| 【10】 | Buffer E | 6 mL | 12 mL | 室温 |
| 【11】 | Buffer F | 6 mL | 12 mL | 室温 |
| 【12】 | Buffer G | 6 mL | 12 mL | 室温 |
| 【13】 | RNase Free Water | 6 mL | 12 mL | 室温 |
| 【14】 | 5× Loading Buffer | 1 mL | 1 mL | 2 ~ 8 °C |
| 【15】 | Normal Rabbit IgG (1 mg/mL) | 30 μL | 60 μL | -25 ~ -18 °C |

注：一次标准的免疫沉淀实验（实验分组：Input、IP 组及 IgG 组），需消耗 2 rxns 试剂量。

*若因实际实验分组设计改变（比如不设置阴性对照 IgG 组，或设有复数的 IP 组时），可能会导致试剂盒组分使用量增加。如有需要，试剂盒中组分可单独加购。

自备材料

| 自备仪器耗材 | 自备试剂 |
|----------------|---|
| 匀浆器（组织样本使用） | 目的蛋白抗体（IP 级） |
| 低温离心机 | PBS 缓冲液（RNase free） |
| 旋转培养器 | RNase-Free ddH ₂ O |
| 磁力架 | 无水乙醇（分析纯，二级） |
| 涡旋器 | β-巯基乙醇（分析纯，二级） |
| RNase free 离心管 | 70 %乙醇（使用 RNase-Free ddH ₂ O 配制） |
| RNase free 枪头 | / |



实验前试剂准备

| 试剂编号 | 名称 | 使用说明 | 一次免疫沉淀使用量 |
|------|-------------------------------|--|--------------|
| 【1】 | 10× Buffer A | 每次使用前混匀，用 RNase-Free ddH ₂ O 稀释为 1×，2~8℃保存，当日使用。 | 13mL (1×) |
| 【2】* | 10× Buffer B | 每次使用前混匀，用 RNase-Free ddH ₂ O 稀释为 1×后加入 0.01 %体积试剂【7】，2~8℃保存，当日使用。 | 10mL (1×) |
| 【3】* | 10× Buffer C | 每次使用前混匀，用 RNase-Free ddH ₂ O 稀释为 1×后加入 0.01 %体积试剂【7】，2~8℃保存，当日使用。 | 10mL (1×) |
| 【4】 | protein A+G beads | 混匀后使用。 | 300 μL |
| 【5】* | Buffer D | 混匀后使用。 | 20 μL |
| 【6】 | 蛋白酶抑制剂 | 室温融解，混匀后使用。 | 10 μL |
| 【7】 | RNase 抑制剂 | 混匀后使用。 | 12 μL |
| 【8】 | DR Columns | / | 3 个 |
| 【9】 | RC Columns | / | 3 个 |
| 【10】 | Buffer E | 每次使用前加入 1 %体积 β-巯基乙醇，当日使用。 | 800 μL (工作液) |
| 【11】 | Buffer F | 使用前加入 1 倍体积无水乙醇。 | 1.5 mL (工作液) |
| 【12】 | Buffer G | 使用前加入 4 倍体积无水乙醇。 | 3 mL (工作液) |
| 【13】 | RNase Free Water | / | 300 μL |
| 【14】 | 5× Loading Buffer | 用 RNase-Free ddH ₂ O 稀释为 1×，当日使用。 | 150 μL (1×) |
| 自备 | RNase-Free ddH ₂ O | / | > 20 mL |
| 自备 | 无水乙醇 | / | 5 mL |
| 自备 | β-巯基乙醇 | / | 10 μL |

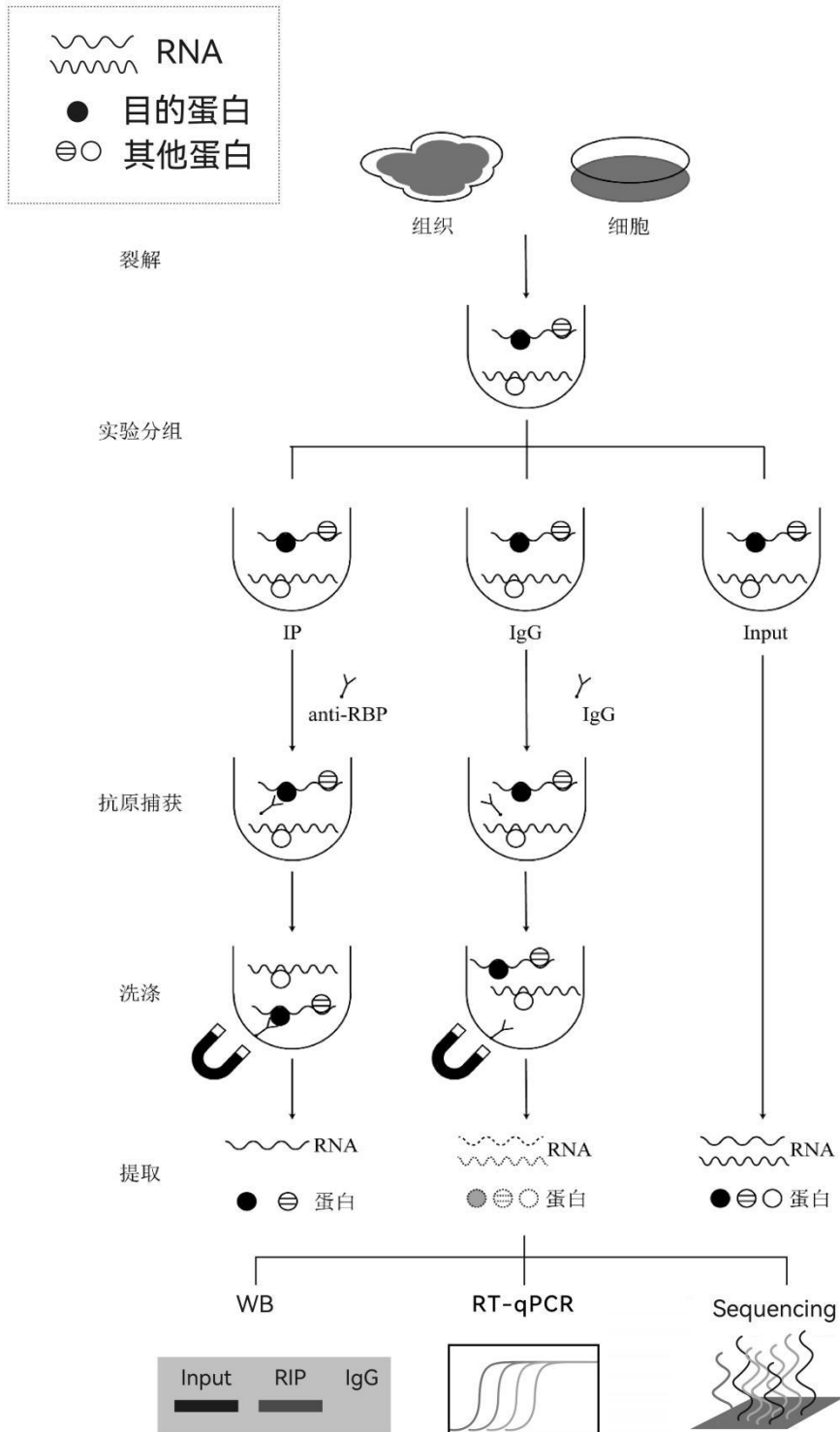
注：1) 以上试剂【1】【2】【3】【10】每次实验前需现配现用；

2) * 标记表示该试剂根据实验需求选择性使用；

3) Buffer E 如有沉淀可 60℃水浴溶解后使用。



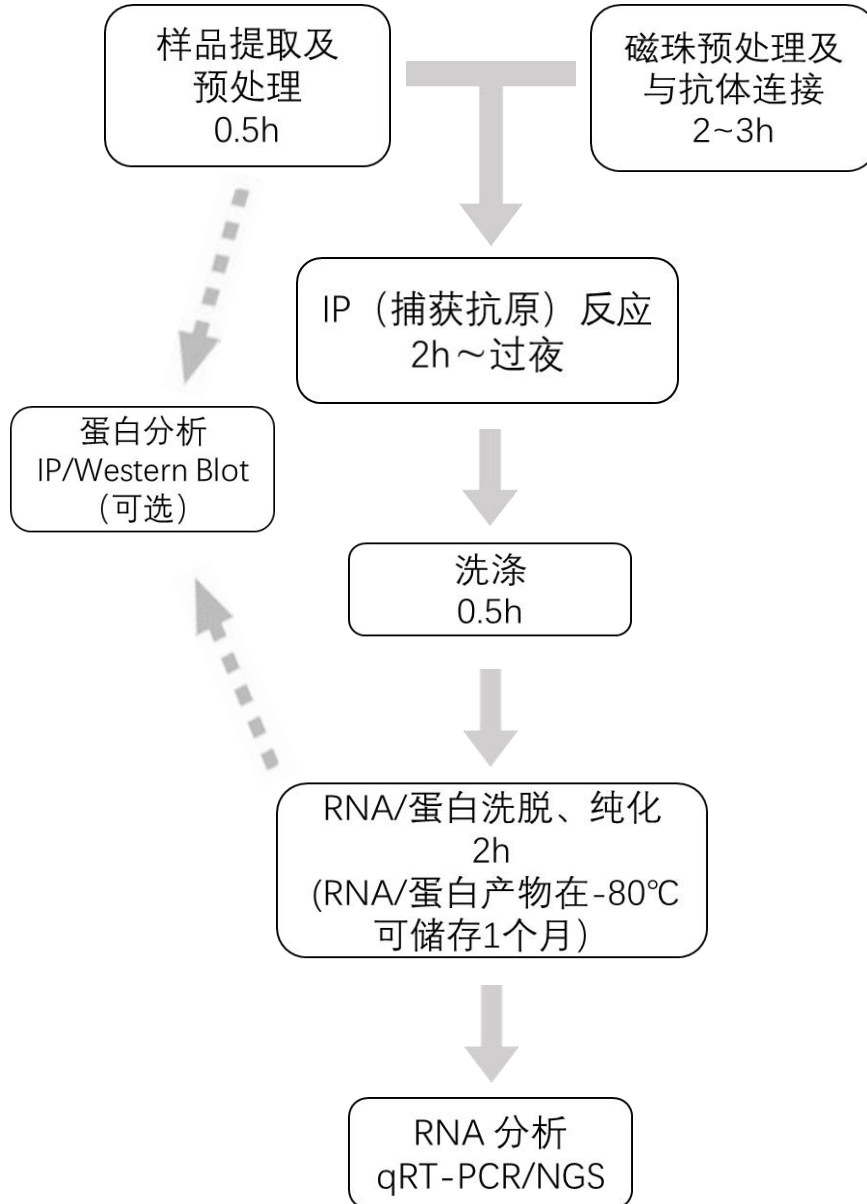
实验操作流程图



实验时间管理



实验前仔细阅读实验操作，参考本实验时间管理图，合理利用时间能更好提高实验效率。





实验前准备

1. 目的蛋白抗体

目的蛋白抗体应为 IP 级，种属应与 IgG 抗体一致。使用量一般为 5 μ g，或参考抗体说明书中推荐的用量。注：如需其他种属来源的 IgG，欢迎联系吉赛生物订购。

2. 细胞裂解

每个 RIP 使用的细胞总数必须根据 RNA 结合蛋白的丰度进行优化。如目的蛋白内源表达低，就需要增加细胞用量。通常，一次 RIP 反应 1E7 的细胞量对应 1mL 稀释后的 Buffer A，但最高 3E7 的细胞量也有测试过可以成功裂解。

3. RNase 控制

在整个实验中，应采取所有标准预防措施以尽量减少 RNase 污染。如所有步骤都应戴手套，所有接触细胞或细胞裂解物的仪器、玻璃器皿和塑料器皿应经认证的无核酸酶或应使用 DEPC 或其他 RNase 灭活试剂进行预处理。试剂盒含有 RNase 抑制剂，请按协议中说明进行操作。

4. 细胞样品准备

1) 贴壁细胞

- 刮取细胞

- ① 从培养皿或培养板上刮下细胞，转移到离心管，细胞计数；
- ② 500 \times g 离心 5 min 收集细胞，弃上清，用预冷的 PBS 洗涤细胞；
- ③ 4 $^{\circ}$ C，500 \times g 离心 5 min 收集细胞，弃上清（可放-80 $^{\circ}$ C 保存）。

- 消化液消化收取细胞

- ① 弃掉培养基，用 PBS 冲洗细胞一次；
- ② 加胰蛋白酶消化解离细胞；
- ③ 加 10 倍体积的完全细胞培养基终止消化，收集细胞计数，转移到离心管；
- ④ 500 \times g 离心 5 min 收集细胞，弃上清，用预冷的 PBS 洗涤细胞；
- ⑤ 4 $^{\circ}$ C，500 \times g 离心 5 min 收集细胞，弃上清（可放-80 $^{\circ}$ C 保存）。

2) 悬浮细胞

- ① 将细胞收到锥形管中，细胞计数；



- ② 500 ×g 离心 5 min 收集细胞，弃上清，用预冷的 PBS 洗涤细胞；
- ③ 4 °C，500 ×g 离心 5min 收集细胞，弃上清（可放-80 °C保存）。

注意事项：

样品保存时间不宜过久，新鲜的样本有利于 RIP 实验的成功。

实验操作

1. 样本提取

● 组织样品：

- 1) 取 100 mg 新鲜组织加入 1 mL 冷 PBS（自备）进行洗涤，去除血液等；
- 2) 将洗净组织放入匀浆器，加入 1 mL Buffer A(1×)工作液、10 μL 蛋白酶抑制剂【6】、10 μL RNase 抑制剂【7】，进行研磨，期间每研磨 1 min 置于冰上冷却 30 s，充分研磨后转置于 1.5 mL 无 RNase 离心管；
- 3) 4 °C，10,000 ×g 离心，10 min 取上清。

● 细胞样品：

- 1) 1×10⁷个收集的细胞加入 1 mL Buffer A(1×)工作液、10 μL 蛋白酶抑制剂【6】、10 μL RNase 抑制剂【7】，吹打混匀，置于冰上裂解 10 min，期间涡旋 2 次，每次 5 s；
- 2) 4 °C，10,000 ×g 离心，10 min 取上清置于无 RNase 离心管中。

注意事项：

- a) 使用无 RNase 的吸头及离心管，尽量降低环境中 RNase 对实验的影响；
- b) 冷 PBS（自备）洗涤应轻柔，勿使细胞组织破碎，PBS 可提前放于 4 °C 预冷；
- c) 细胞裂解时，应温和，防止核酸析出聚集成团；如果裂解不充分，可以适当增加裂解时间，但不宜过长，因为会使 RNA 降解；
- d) 组织样品离心后取上清，应避免吸取到脂肪等不溶杂质。

2. 样品预处理

- 1) 取 50 μL 上清液至新的离心管中标记为 Input-protein，加入 50 μL Loading buffer(1×)【14】，混匀后沸水浴 5 min，-25 ~ -18 °C 保存，用于 WB 检测。
- 2) 取 100 μL 上清液至新的离心管中标记为 Input 组，-25 ~ -18 °C 保存，用于 RNA 提取。
- 3) *剩余上清液中加入 100 μL protein A+G beads【4】，于 4 °C、10 转/min 旋转反应 10 min；



4) *置于磁力架，取上清，弃磁珠；

注意事项：

- a) 如果当天不能进行第 5 步（捕获抗原），用于 RNA 提取的 Input 组上清液中需加入 200 μ L Buffer E 【10】（已加 1% β -巯基乙醇），立即 -80°C 保存。在第 5 步捕获抗原前半小时完成样品的处理，可减少反复冻融对样品的伤害。
- b) 3)* 4)* 步骤为可选择步骤，使用 protein A+G beads 【4】对样品进行预处理，对改善磁珠非特异结合有一定的帮助。

3. 磁珠预处理

- 1) 取 200 μ L protein A+G beads 【4】，加入 1 mL Buffer A(1 \times)，涡旋洗涤 5 s，置于磁力架，弃上清；
- 2) 重复洗涤 1 次后，若产物用于测序，则可直接跳到本步骤中第 6)；(Buffer D 其中的成分或对测序有影响)；
- 3) 加入 1 mL Buffer A(1 \times)，20 μ L Buffer D 【5】，于 4°C 、10 转/min 旋转反应 30 min；
- 4) 置于磁力架，弃上清；
- 5) 加入 1 mL Buffer A(1 \times)，涡旋洗涤 5 s，置于磁力架，弃上清；
- 6) 加入 1 mL Buffer A(1 \times)，充分混匀后分为 2 份，各 500 μ L，分别标记为 IP 组和 IgG 组；
- 7) 置于磁力架，弃上清。

4. 抗体与磁珠连接

- 1) 经预处理的两个磁珠各加入 1 mL Buffer A(1 \times)，IP 组加入 5 μ g 的 IP 抗体，IgG 组加入 5 μ g 的 IgG 【15】，于 4°C 、10 转/min 旋转反应 1~2 h；
- 2) 反应完成后，置于磁力架，弃上清；
- 3) 使用 1 mL Buffer A(1 \times) 涡旋洗涤 5 s，置于磁力架，弃上清；
- 4) 重复洗涤 1 次，置于磁力架，弃上清。

5. 捕获抗原

- 1) 分别在结合了 IP 抗体 (IP 组) 或 IgG (IgG 组) 的磁珠中加入 350 μ L Buffer A(1 \times) 和 400 μ L 组织或细胞裂解上清，于 4°C 、10 转/min 旋转反应 2 h ~ 过夜。
- 2) 反应完成后，置于磁力架，弃上清。



注意事项:

- a) 长时间的反应会增加背景;
- b) 适当地增加反应时间或按以下操作代替步骤 4、步骤 5 的孵育条件或许对目标的捕获有利;
 - ① 2.5 μg 抗体与磁珠、2.5 μg 抗体与裂解上清分别进行 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 转/min 旋转反应 1 h ~ 过夜孵育。
 - ② 反应完成后将抗体-磁珠复合物、抗体-裂解上清复合物进行混合, 继续进行 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 转/min 旋转反应 2 h。
- c) 如果抗原的丰度较低, 可适当减少 Buffer A(1 \times)的加入量, 更好的选择是在提取的时候使用更大的组织或细胞量。

6. 洗涤

- 1) 在磁珠复合物 (IP 组、IgG 组) 中各加入 1 mL Buffer B(1 \times)或 Buffer C(1 \times), 涡旋洗涤 2min, 置于磁力架, 弃上清;
- 2) 重复步骤 6. 1) 洗涤 2 ~ 4 次。
- 3) 在磁珠复合物 (IP 组、IgG 组) 中各加入 1 mL Buffer B(1 \times)或 Buffer C(1 \times), 涡旋洗涤 2 min, 各吸取 100 μL 磁珠复合物至新离心管中, 分别标记为 IP-protein 和 IgG-protein。
- 4) IP 组、IgG 组、IP-protein 和 IgG-protein 磁珠复合物置于磁力架, 弃上清。

注意事项:

- a) 多次洗涤对改善背景有一定的帮助;
- b) 如果想进一步降低背景, 可以使用 Buffer C(1 \times)进行洗涤, 但可能会破坏目标复合物之间的互作。

7. 提取蛋白

- 1) IP-protein 和 IgG-protein 磁珠复合物加入 50 μL loading buffer(1 \times)【14】, 混匀后沸水浴 5 min, 置于磁力架, 收集上清, 进行 WB 检测。

8. 提取 RNA

- 1) 洗脱结合在磁珠上的复合物 (Input 组使用相同方法提取)
 - ① 在 IP 组和 IgG 组磁珠复合物中各加入 300 μL Buffer E【10】, Input 组加入 200 μL Buffer E【10】, 涡旋 30 s;
 - ② 置于磁力架, 收集上清;
- 2) 过柱去除 DNA
 - ① 将上清加入 DR Columns【8】滤柱;
 - ② 10,000 $\times g$, 离心 1 min, 收集滤液;



③ 在滤液中加入等体积 (300 μ L) 的 70 %乙醇, 使用移液器吹打 3 ~ 5 次;

3) 过柱纯化 RNA

① 将混有 70 %乙醇的滤液加入到 RC Columns 【9】 滤柱;

② 10,000 \times g, 离心 30~60 s, 弃滤液;

③ 在 RC Columns 【9】 滤柱上加入 500 μ L Buffer F (含无水乙醇) 【11】 ;

④ 10,000 \times g, 离心 30~60 s, 弃滤液;

⑤ 在 RC Columns 【9】 滤柱上加入 500 μ L Buffer G (含无水乙醇) 【12】 ;

⑥ 10,000 \times g, 离心 30~60 s, 弃滤液;

⑦ 重复⑤~⑥步骤一次;

⑧ 空柱 12,000 \times g, 离心 3 min, 弃滤液;

⑨ 将滤柱转移至新的无 RNase 离心管中, 垂直悬空加入 30~100 μ L RNase free water 【13】 至柱膜中央;

⑩ 室温静置 3 min; 12,000 \times g, 离心 3 min, 将收集到的 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C; 或将其加至柱膜中央, 重复步骤⑩进行第二次洗脱可提高 RNA 产量。

注意事项:

a) Input 样品量不宜过多, 否则会堵塞滤柱;

b) 反复对样品进行冻融会造成 RNA 的降解, 确保冻融不超过 2 次;

c) 试剂盒中提供的 RNase Free Water 【13】 不含抑菌剂, 操作时可能会引入细菌或真菌污染。可使用新的 RNase Free Water 【13】 或 RNase-Free ddH₂O (自备) ;

d) 70 %乙醇可使用 Buffer G (含无水乙醇) 【12】 替代;

e) 由于洗脱柱的容量及洗脱能力有限, 因此如果产物量不够下游实验要求, 如测序, 可以重复实验, 合并产物;

f) 过柱纯化的 RNA, 如果用于测序, 建议加入不超过 30 μ L 的 RNase free water, 避免浓度过低。

9. 产物分析

1) 蛋白产物分析

RIP 实验的蛋白产量一般较低, 可直接取 20 μ L 进行 WB 检测。目的蛋白丰度、富集效率、抗体质量等均可从 WB 结果中判断, 可依据结果对实验条件或操作进行相应调整。

2) RNA 产物分析

洗脱纯化的 RNA, 产物量一般不足以直接测量出浓度, 可通过定量 RT-PCR (如果已知 RBP 的结合靶基因), 或通过测序技术进行分析。

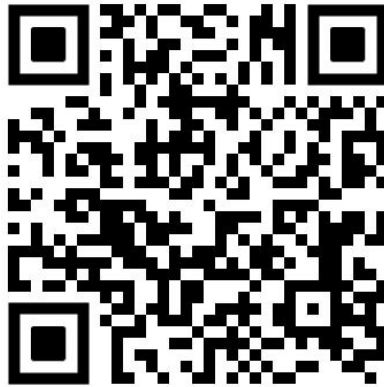


● qPCR 数据处理

根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算目标基因相对表达情况：

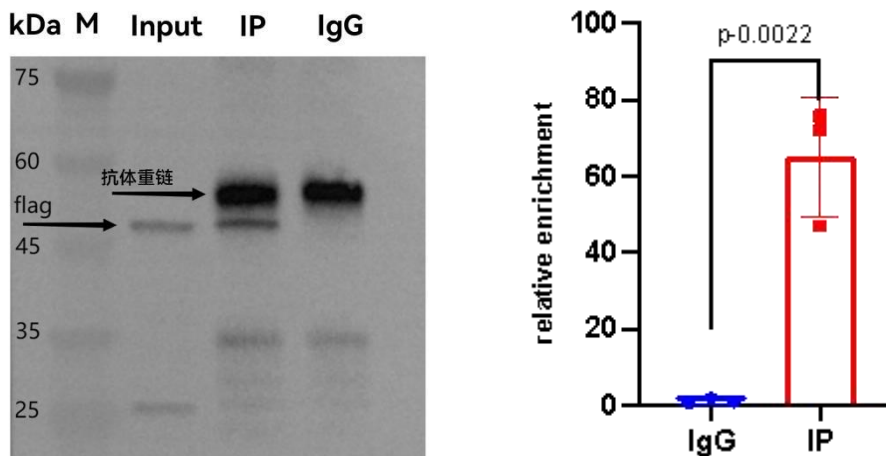
$$\Delta\Delta C_t = (Ct_{IP} - Ct_{Input}) - (Ct_{IgG} - Ct_{Input}) = X \quad (\text{Input 组目标基因 } Ct_{Input} \text{ 值作为参照 } Ct \text{ 值})$$

则目标基因的 IP 组表达水平为 IgG 组的 2^{-X} 倍。



扫码可下载计算模板表格

3) 结果示例图



Western Blot 检测 RIP 实验下拉的目标蛋白质结果示例图（左），qPCR 检测 RIP 实验下拉的目标 RNA 结果示例图（右）。

注意事项：

- 对于反转录，用户可以使用我司的反转录试剂盒或其他商用反转录试剂盒；
- 由于 RNA 浓度未知，建议取所用反转录体系的最大 RNA 上样量进行逆转录。



常见问题及处理方法

| 问题 | 原因 | 建议解决方案 |
|---------------------------|----------------------------|--|
| qRT-PCR 结果异常, CT 值过高或无 | RNA 产物不足 | 增加样本量; |
| | RNA 在选定的细胞中或是给定的培养条件下为非靶基因 | 更换细胞或更换培养条件; |
| | miRNA 没有有效洗脱 | 将 8-2)-③步换为无水乙醇; |
| WB 检测结果异常, 条带不符或无 | 条带信号不足 | 增加或减少样本量 (样本量过多, 裂解不充分, 无法有效释放目的蛋白); 增加抗体用量; |
| | 抗体未免疫沉淀到目的蛋白 | 检查是否用了正确的 IP 级抗体; 用裂解物预检或取部分裂解物作为产物 WB 检测的一个对照检测抗体质量、裂解液裂解效果等; 更换其他品牌抗体; |
| | 目的蛋白内源表达过低 | 增加样本量或做目的蛋白过表达; |
| | 蛋白降解 | 使用新鲜或冻存时间不长的样本; |
| | 非特异性结合蛋白条带过多 | 减少孵育时间、增加洗涤次数; |
| IP 组和 IgG 组需要差异倍数多少才是有效果? | / | 有统计意义即可; |
| 裂解细胞样品, 适用于裂解细菌吗? | / | 可以, 细菌需要用液氮速冻研磨后, 再进行裂解步骤即可。 |



参考文献

1. Lv Yue, Lu Gang, Cai Yuling et al. RBM46 is essential for gametogenesis and functions in post-transcriptional roles affecting meiotic cohesin subunits.[J] .Protein Cell, 2023, 14: 51-63.
2. Fan Hong, Yang Jialei, Zhang Kun et al. IRES-mediated Wnt2 translation in apoptotic neurons triggers astrocyte dedifferentiation.[J] .NPJ Regen Med, 2022, 7: 42.
3. Liang Leilei, Zhu Yunshu, Li Jian et al. ALKBH5-mediated m6A modification of circCCDC134 facilitates cervical cancer metastasis by enhancing HIF1A transcription.[J] .J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41: 261.



扫一扫，了解更多

广州吉赛生物科技股份有限公司

Guangzhou Geneseed Biotech Co.,Ltd.

Tel: 400-8989-400 E-mail: geneseed@geneseed.com.cn