

# PureBinding<sup>®</sup> 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 .....    | 5  |
| 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

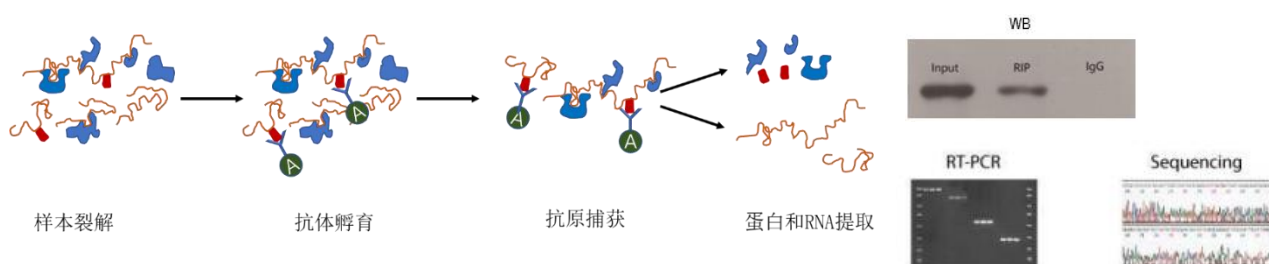
RNA Immunoprecipitation (RIP) 是研究细胞内 RNA 与蛋白结合的技术，是了解转录后调控网络动态过程的有力工具。

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      | 10mL       | 20mL       | 2 ~ 8°C     |
| 【2】  | 10× Buffer B      | 10mL       | 20mL       | 2 ~ 8°C     |
| 【3】  | 10× Buffer C      | 10mL       | 20mL       | 2 ~ 8°C     |
| 【4】  | protein A+G beads | 2mL        | 4mL        | 2 ~ 8°C     |
| 【5】  | Buffer D          | 150μL      | 300μL      | 2 ~ 8°C     |
| 【6】  | 蛋白酶抑制剂            | 80μL       | 160μL      | -25 ~ -18°C |
| 【7】  | RNase 抑制剂         | 80μL       | 160μL      | -25 ~ -18°C |
| 【8】  | DR Columns        | 18 个       | 36 个       | 室温          |
| 【9】  | RC Columns        | 18 个       | 36 个       | 室温          |
| 【10】 | Buffer E          | 6mL        | 12mL       | 室温          |
| 【11】 | Buffer F          | 6mL        | 12mL       | 室温          |
| 【12】 | Buffer G          | 6mL        | 12mL       | 室温          |
| 【13】 | RNase Free Water  | 6mL        | 12mL       | 室温          |

注：对照（IgG）组与实验（IP）组消耗试剂量相同，一次免疫沉淀（含 Input 组、IP 组及 IgG 组），要消耗 2 rxns 试剂量。

## 自备材料

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

## 实验前试剂准备

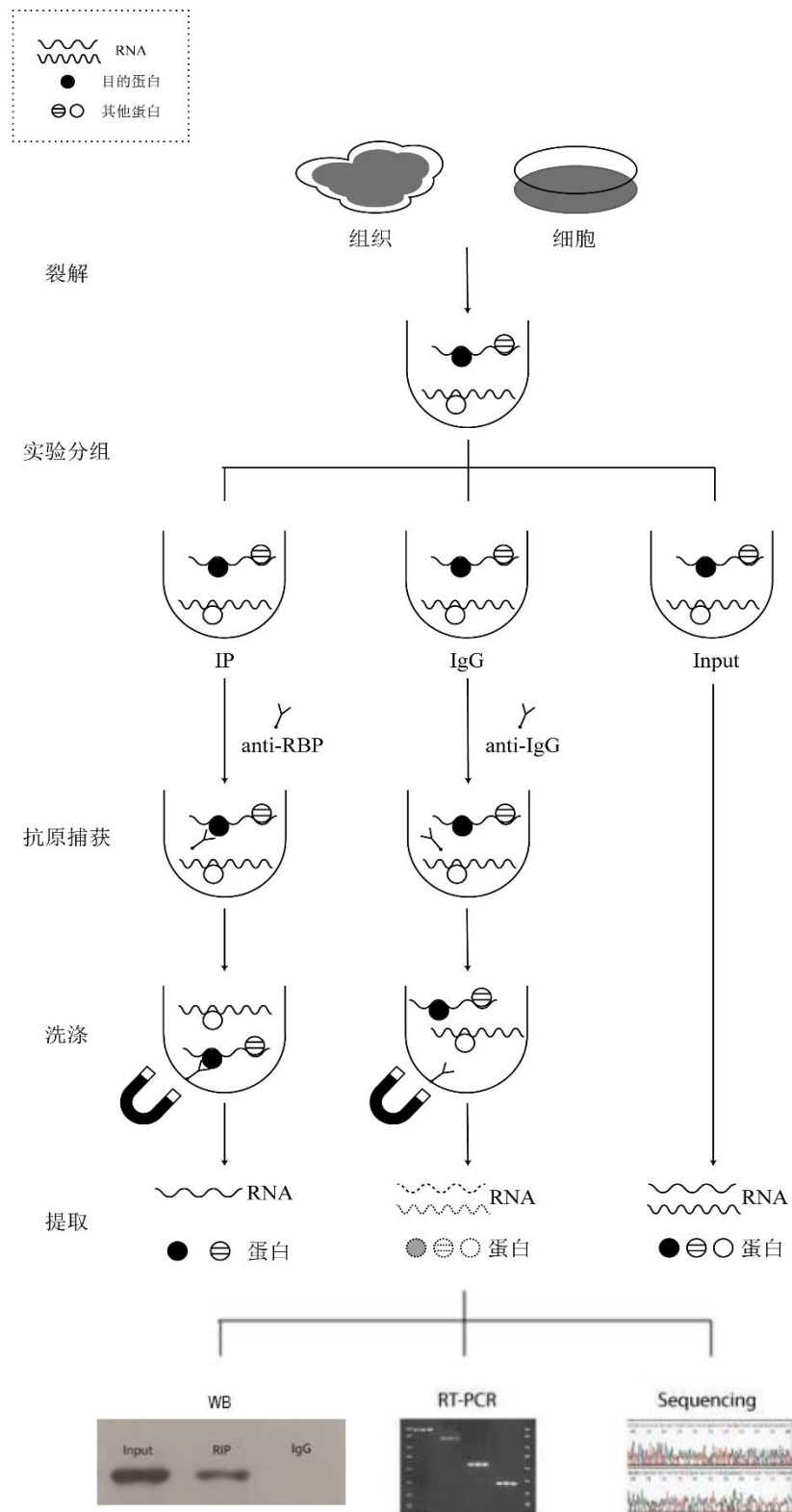
| 试剂编号  | 名称                | 使用说明                                                 | 一次免疫沉淀使用量   |
|-------|-------------------|------------------------------------------------------|-------------|
| 【1】   | 10× Buffer A      | 每次使用前混匀, 用 DEPC 水稀释为 1×, 4℃保存, 当日使用。                 | 13mL (1×)   |
| 【2】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

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;

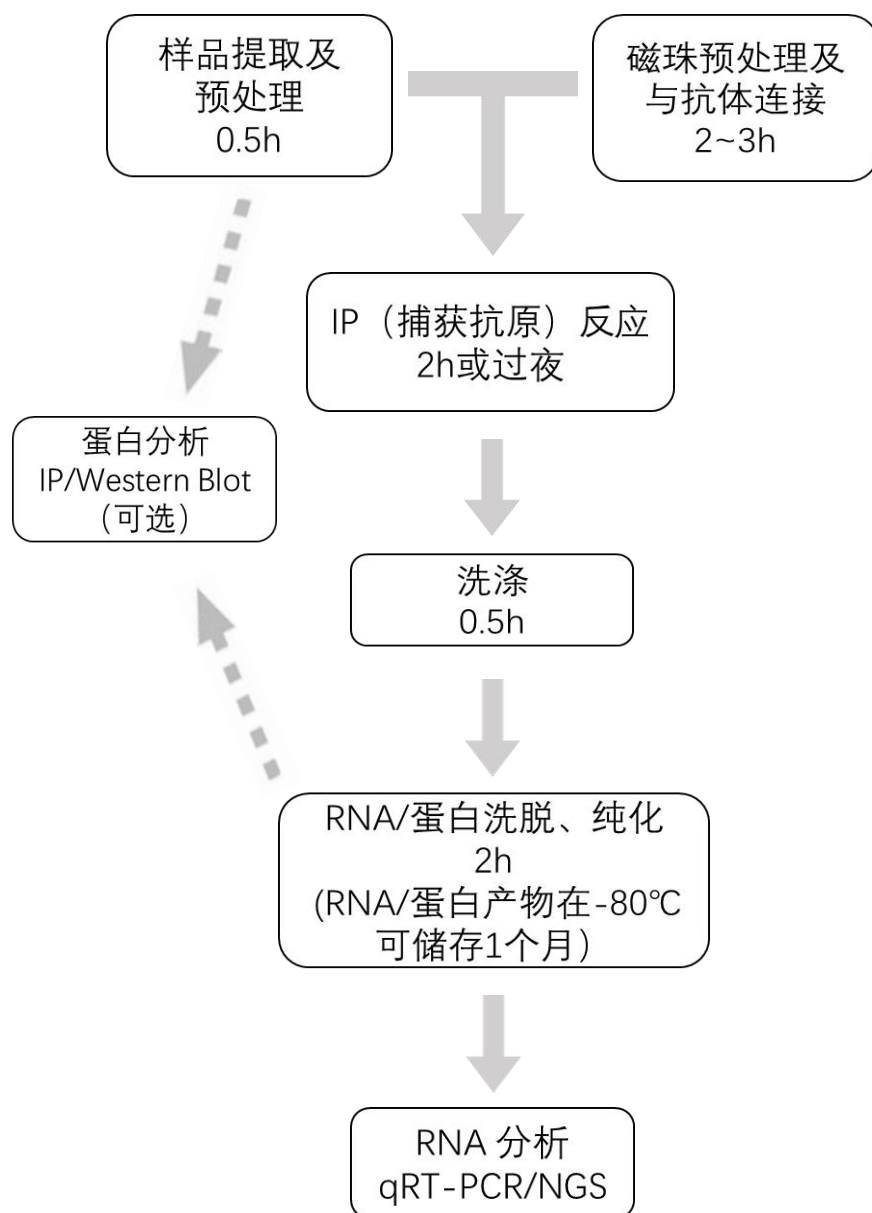
3) Buffer E 如有沉淀可 60℃水浴溶解后使用。

# 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

目的蛋白抗体和 IgG 抗体应种属一致，且为 IP 级。使用量一般为 5 $\mu$ g，或参考抗体说明书中推荐的用量。

### 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 5min 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 5min 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 5min 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 5min 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 5min 收集细胞，弃上清，用预冷的 PBS 洗涤细胞；

③ 4℃，500×g 离心 5min 收集细胞，弃上清（可放-80℃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 100mg 新鲜组织加入 1mL 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 1mL Buffer A(1×)工作液、10μL 蛋白酶抑制剂【6】、10μL 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℃，10,000×g 离心，10 min 取上清。

#### ● 细胞样品：

1) 1×10<sup>7</sup>个收集的细胞加入 1 mL Buffer A(1×)工作液、10μL 蛋白酶抑制剂【6】、10μL 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℃，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℃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 50μL 上清液至新的离心管中标记为 Input 组，加入 50μL Loading buffer，混匀后沸水浴 5min，-20℃保存，用于 WB 检测。

2) 取 100μL 上清液至新的离心管中标记为 Input 组，-20℃保存，用于 RNA 提取。

3) \*剩余上清液中加入 100μL protein A+G beads【4】，于 4℃，10 转/min 旋转反应 10min；

---

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 $\mu$ L Buffer E【10】 (已加 1%  $\beta$ -巯基乙醇), 立即-80 $^{\circ}$ 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 $\mu$ L protein A+G beads【4】, 加入 1mL 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 1mL Buffer A(1 $\times$ ), 20 $\mu$ L Buffer D【5】, 于 4 $^{\circ}$ C, 10 转/min 旋转反应 30min;
- 4) 置于磁力架, 弃上清;
- 5) 加入 1mL Buffer A(1 $\times$ ), 涡旋洗涤 5 s, 置于磁力架, 弃上清;
- 6) 加入 1mL Buffer A(1 $\times$ ), 充分混匀后分为 2 份, 各 500 $\mu$ 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) 经预处理的两管磁珠各加入 1mL Buffer A(1 $\times$ ), IP 组加入 5 $\mu$ g 的 IP 抗体, IgG 组加入 5 $\mu$ g 的 IgG, 4 $^{\circ}$ 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 1mL 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 $\mu$ L Buffer A(1 $\times$ ) 和 400 $\mu$ L 组织或细胞裂解上清, 4 $^{\circ}$ C、10 转/min 旋转反应 2h ~ 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许对目标的捕获有利;

c) 如果抗原的丰度较低, 可适当减少 Buffer A(1×)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 1mL Buffer B(1×)或 Buffer C(1×), 涡旋洗涤 2min, 置于磁力架, 弃上清;

2) 重复洗涤 3 ~ 5 次。

### 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×)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) 最后一次洗涤时, 各吸取 100μL 磁珠复合物至新离心管中, 置于磁力架, 弃上清。

2) 加入 50μL loading buffer, 混匀后沸水浴 5 分钟, 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 在磁珠复合物 (IP 组、IgG 组) 中各加入 300μL Buffer E 【10】, Input 组加入 200μL 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×g, 离心 1 min, 收集滤液;

③ 在滤液中加入等体积的 70%乙醇, 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×g, 离心 30~60 s, 弃滤液;

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

④ 10,000×g, 离心 30~60 s, 弃滤液;

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

- 
- ⑥ 10,000×g, 离心 30~60 s, 弃滤液;
  - ⑦ 重复⑤~⑥步骤一次;
  - ⑧ 空柱 12,000×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 30~100μL RNase free water 【13】至柱膜中央;
  - ⑩ 室温静置 3 min; 12,000×g, 离心 3 min, 将收集到的 RNA 保存于-80℃; 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 DEPC 水 (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 30μL 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 20μL 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。

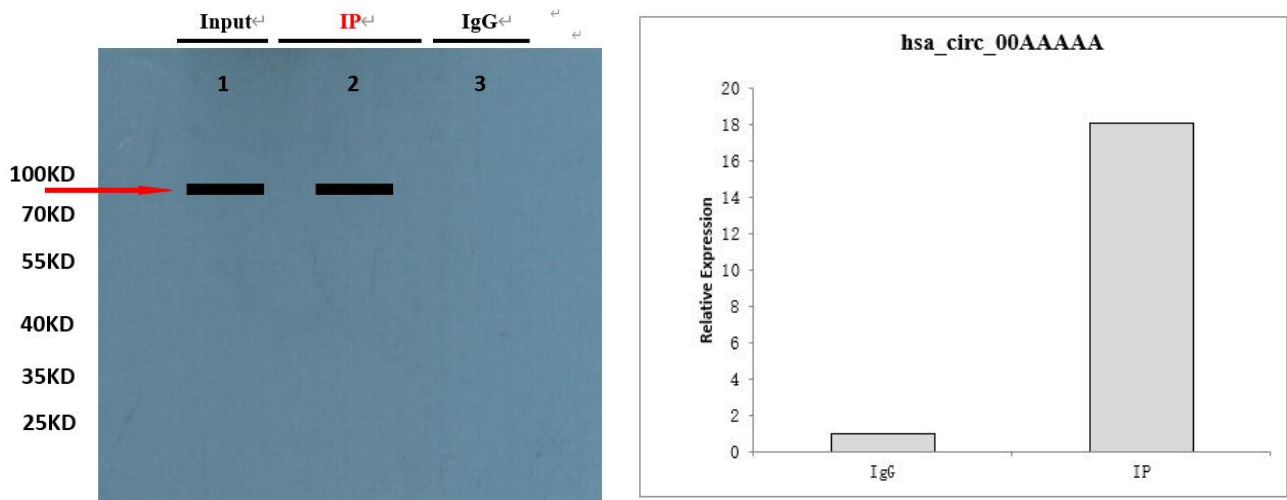
#### ● qPCR 数据处理

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

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

则目标基因的 IP 组表达水平为 IgG 组的  $2^{-X}$  倍。

### 3) 结果示例图



#### 注意事项:

- a) 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；
- b) 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);<br>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;<br>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;<br>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 Jiale,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.