

## BeyoRIP™ RIP Assay Kit (Protein A/G琼脂糖)

产品编号	产品名称	包装
P1801S	BeyoRIP™ RIP Assay Kit (Protein A/G琼脂糖)	22次

### 产品简介:

- BeyoRIP™ RIP Assay Kit (Protein A/G琼脂糖), 即BeyoRIP™ RIP Assay Kit (Protein A/G Agarose)、BeyoRIP™ RIP Assay Kit with Protein A/G Agarose或BeyoRIP™ RNA Immunoprecipitation Assay Kit with Protein A/G Agarose, 中文名为BeyoRIP™ RNA免疫沉淀检测试剂盒、RNA结合蛋白免疫沉淀试剂盒或RIP检测试剂盒, 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。
- 转录水平对于真核生物基因表达至关重要, 但mRNA水平并不总是与蛋白质的水平直接相关, 这种差异的部分原因是mRNA的转录后调控[1]。转录后调控的关键是RNA结合蛋白(RNA-binding protein, RBP)及其相关mRNA靶标的相互作用, RBP通过与mRNA靶标形成核糖核蛋白(Ribonucleoprotein, RNP)复合物来影响mRNA的定位、修饰、稳定性和翻译水平[2]。研究发现, 随着原核生物向真核生物的进化和核膜的发育, RBP的数量显著增加, 转录后的基因表达研究往往集中于RBP。从RNP的复合物中识别这些未知的mRNA靶标对于理解RBP的机制和功能及其对蛋白质表达水平的影响至关重要。此外, RNA结合的蛋白不仅仅是mRNA, 还包含各种非编码RNA例如长链非编码RNA (Long non-coding RNA, lncRNA)和小RNA (Small RNA, sRNA)等。染色质免疫沉淀(Chromatin Immunoprecipitation, ChIP)可用于检测细胞内DNA结合蛋白结合的DNA靶标。与之类似, RNA免疫沉淀(RNA Immunoprecipitation, RIP)可用于检测细胞内RNA结合蛋白结合的RNA靶标。通过RBP的特异性抗体免疫沉淀RNP复合物, 然后分离纯化在RNP复合物中的RNA, 再通过qRT-PCR或高通量测序等方法检测相应的RNA (图1)。RIP检测有助于了解蛋白和RNA的相互作用, 探索转录后基因表达调控的深入的分子机制。

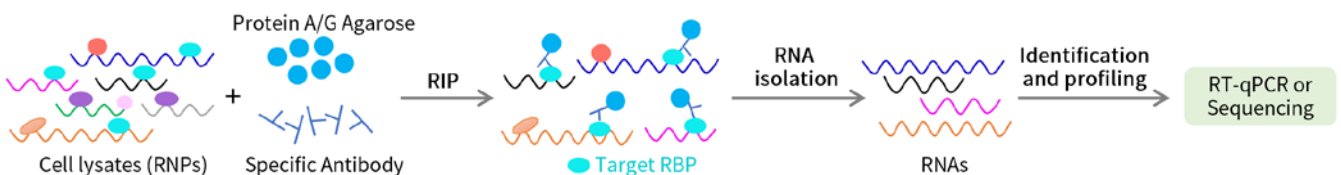


图1. 碧云天BeyoRIP™ RIP Assay Kit (Protein A/G琼脂糖) (P1801)工作原理图。

- BeyoRIP™ RIP Assay Kit (Protein A/G琼脂糖)采用了Protein A/G Agarose, 比Protein A Agarose或Protein G Agarose适合于免疫沉淀更多种类的抗体, 包括mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, rat IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, rabbit IgG, rabbit and goat polyclonal Abs, 以及human IgG1, IgG2, IgG3和IgG4。
- BeyoRIP™ RIP Assay Kit (Protein A/G琼脂糖)提供了RIP实验所需所有试剂, 其中, RIP级别的Protein A/G Agarose由Protein A/G共价连接到4%的高交联度、高流速琼脂糖(cross-linked, 4% Agarose, Fast Flow)上, 每毫升Protein A/G agarose beads (沉淀物)可以结合超过25mg human IgG; 蛋白酶和核糖核酸酶抑制剂, 包括PMSF、RNase Inhibitor, 可用于保护RNP复合物在免疫沉淀过程中不被降解; RNA纯化试剂盒如RNAeasy™动物RNA抽提试剂盒(离心柱式) (R0027)或Beyozol (R0011), RNA反转录与定量检测试剂盒BeyoRT™ Q cDNA第一链合成试剂盒 (D7190)和BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X) (D7501/D7503/D7507/D7260/D7262/D7265)可以向碧云天单独订购。
- 本试剂盒用于BeyoRIP™ Antibody and Primer Pair Kit for HuR RIP Assay (P1821)的免疫沉淀效果参考图2。

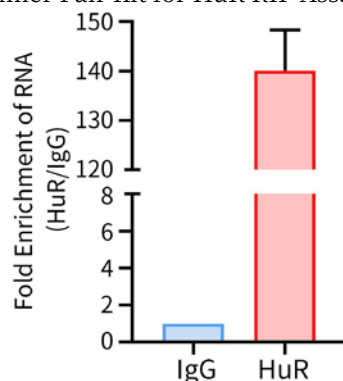


图2. 碧云天BeyoRIP™ RIP Assay Kit (Protein A/G琼脂糖) (P1801)用于BeyoRIP™ Antibody and Primer Pair Kit for HuR

RIP Assay (P1821)的免疫沉淀效果图。HeLa细胞(每个免疫沉淀相当于150万个细胞量)制备成RIP裂解物,用5 $\mu$ g阴性对照IgG和5 $\mu$ g HuR抗体(RIP阳性对照)进行免疫沉淀, HuR抗体相对于阴性对照IgG的RNA富集程度通过本说明后附的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算获得。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异,图中数据仅供参考。

➢ 本BeyoRIP™ RIP Assay Kit (Protein A/G琼脂糖)如果用于常规的RNA免疫沉淀,共可以免疫沉淀22个样品。

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P1801S-1	Protein A/G Agarose	700 $\mu$ l
P1801S-2	Lysis Buffer	10ml
P1801S-3	NT2 Wash Buffer	250ml
P1801S-4	Elution Buffer	3ml
P1801S-5	40U/ $\mu$ l RNase Inhibitor	30 $\mu$ l
P1801S-6	0.5M DTT	20 $\mu$ l
P1801S-7	100mM PMSF	20 $\mu$ l
—	说明书	1份

### 保存条件:

Protein A/G Agarose 4 $^{\circ}$ C保存,其它组分-20 $^{\circ}$ C保存,至少一年有效。Lysis Buffer、NT2 Wash Buffer也可以4 $^{\circ}$ C保存,至少一个月有效。

### 注意事项:

- 操作过程要严格保证无RNase污染。请戴上口罩和手套操作,尽量防止人体表面的RNase污染样品。操作时应避免对着样品或所使用的试剂盒或耗材呼气或说话,以防RNase污染。对于操作环境中RNase的去除,推荐使用碧云天生产的RNase and DNase Away (R0123)以去除实验桌、仪器设备表面或其它接触面上的RNase。
- 所用试剂和耗材都要求是RNase-free,操作时应小心,避免被污染。如果耗材可能有RNase污染,可考虑用0.01%的DEPC水溶液浸泡过夜,然后高温高压灭菌并烘干。
- 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。
- Protein A/G Agarose使用前一定要充分重悬,即充分颠倒若干次使混合均匀。
- 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 Inhibitor和PMSF。所有步骤尽量在冰上,以降低可能的RNase活性。
- 洗涤Protein A/G Agarose时小心吸除上清,宁可留下少量上清也不吸掉Protein A/G Agarose,背景较高时,可增加洗涤次数。
- 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。推荐使用BeyoRIP™ Antibody and Primer Pair Kit for HuR RIP Assay (P1821)进行RIP体系的验证。
- 本试剂盒未提供阴性对照抗体IgG,需要向碧云天单独订购与特异性目的蛋白抗体相对应种属的IgG,如兔IgG (A7016)、人IgG (A7001)、山羊IgG (A7007)、小鼠IgG (A7028)、大鼠IgG (A7031)和驴IgG (A7039)。
- 本试剂盒仅限于专业人员的科学研究用,不得用于临床诊断或治疗,不得用于食品或药品,不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 使用说明:

通常一次RIP反应(即使用一种抗体进行一次免疫沉淀)需要50-200万个细胞,所需Lysis Buffer 100-400 $\mu$ l,所需细胞量取决于目标RNA结合蛋白的表达丰度和所结合的RNA的丰度。用户可根据所研究的RNA结合蛋白和RNA靶标的丰度的不同,调整RIP实验所使用的细胞量及对应的Lysis Buffer用量。完整的RIP一般包括阴性对照IgG组、阳性对照组和目的蛋白组。本使用说明以一次RIP反应需要使用150万个细胞,所需Lysis Buffer 300 $\mu$ l为例。

#### 1. 洗涤Protein A/G Agarose。

由于Protein A/G Agarose储存在特殊保护液中,所以需要在加入样品前适当洗涤。

- 用移液器轻轻吹打重悬Protein A/G Agarose,按照每300 $\mu$ l样品需30 $\mu$ l Protein A/G Agarose悬浊液,取适量Protein A/G Agarose至一洁净离心管中(FTUB015),加入1ml NT2 Wash Buffer。
- 用移液器轻轻吹打重悬Protein A/G Agarose。4 $^{\circ}$ C,约1000 $\times$ g离心1分钟,去除上清。共重复洗涤三次。

#### 2. Protein A/G Agarose与抗体预结合。

- 按照每30 $\mu$ l Protein A/G Agarose悬浊液需100 $\mu$ l NT2 Wash Buffer的量,取适量NT2 Wash Buffer加入到洗涤后的Protein A/G Agarose中,适当重悬。
- 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 $^{\circ}$ C摇床孵育1-4小时。推荐使用BeyoShaker™数字式翘板摇床(E6673)或BeyoVortex™基础型旋转混匀仪(E6800)。

注1: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2: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 $\mu$ g。

注3: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。

### 3. 样品的制备。

- 对于贴壁细胞，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(FSCP023/FSCP029)刮离细胞后进行细胞计数。
- 一次RIP反应按照每150万个细胞加入300 $\mu$ l Lysis Buffer的比例加入Lysis Buffer。用移液器吹打数下，使Lysis Buffer和细胞充分接触以有效裂解细胞。  
注：Lysis Buffer中需加入终浓度为1mM的DTT、100U/ml的RNase Inhibitor和0.2mM的PMSF。例如配制1ml Lysis Buffer，需同时向Lysis Buffer中加入2 $\mu$ l 0.5M DTT、2.5 $\mu$ l 40U/ $\mu$ l RNase Inhibitor和2 $\mu$ l 100mM PMSF。
- 在冰浴上孵育5-15分钟，以充分裂解细胞。
- 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 $^{\circ}$ C，14,000 $\times$ 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 $\mu$ l (一次RIP反应的10%裂解液)样品作为Input用于后续检测。Input须-80 $^{\circ}$ C保存。
- 对于组织样品，通常按照15-30mg组织加入300 $\mu$ l Lysis Buffer的比例加入Lysis Buffer，使用TissueMaster<sup>™</sup>高通量组织研磨仪(1.5/2ml $\times$ 48) (E6618)、Tissue Master<sup>™</sup>手持式组织研磨仪(E6600)或玻璃匀浆器在约4 $^{\circ}$ C或冰浴等低温条件下匀浆。将匀浆液在4 $^{\circ}$ C，14,000 $\times$ 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 $\mu$ l (一次RIP反应的10%裂解液)样品作为Input用于后续检测。Input须-80 $^{\circ}$ C保存。  
注：本步骤加入的Lysis Buffer同步骤3b，也需要在Lysis Buffer中需加入终浓度为1mM的DTT、100U/ml的RNase Inhibitor和0.2mM的PMSF。

### 4. 免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP)。

- 步骤2中Protein A/G Agarose与抗体预结合后，4 $^{\circ}$ C，约1000 $\times$ g离心1分钟，去除预结合完毕Protein A/G Agarose的上清。
- 取270 $\mu$ l细胞或组织样品裂解液，加入到抗体预结合Protein A/G Agarose中，颠倒混匀后，4 $^{\circ}$ 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1：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 $^{\circ}$ C摇床孵育4小时。

注2：也可先将目的蛋白特异性抗体或阴性对照IgG与样品4 $^{\circ}$ C摇床孵育4小时或过夜后，再加入30 $\mu$ l Protein A/G Agarose悬浊液室温孵育30分钟。

### 5. 洗脱。

- 4 $^{\circ}$ C，约1000 $\times$ g离心1分钟，去除上清。
- 加入1ml的NT2 Wash Buffer，用移液器轻轻吹打重悬Protein A/G Agarose，4 $^{\circ}$ C，约1000 $\times$ g离心1分钟，共重复洗涤四次，最后弃上清。
- 加入100 $\mu$ l Elution Buffer，混悬均匀后，55 $^{\circ}$ C孵育30分钟。

### 6. RNA纯化。

参考碧云天RNAeasy<sup>™</sup>动物RNA抽提试剂盒(离心柱式) (R0027)，将Elution Buffer与Protein A/G Agarose的混合液与RNAeasy<sup>™</sup>动物RNA抽提试剂盒的结合液混合，进行过柱纯化RNA。步骤3d中Input组(30 $\mu$ l)用RNase-free Water补足体积至100 $\mu$ l，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 $^{\circ}$ C保存。RNase-free Water推荐使用BeyoPure<sup>™</sup> Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile) (ST876)。

注：本实验对DNA残留较敏感，如有必要可以在纯化的过程中需按RNAeasy<sup>™</sup>动物RNA抽提试剂盒(离心柱式) (R0027)中的建议添加DNase I去除DNA。

### 7. RNA分析或验证。

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。

- 反转录可以酌情使用具有Oligo(dT)、Random primers或特定引物。Oligo(dT)适用于带有Poly(A)尾的RNA的反转录，Random primers适用于任何长链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。推荐使用碧云天的BeyoRT<sup>™</sup> Q cDNA第一链合成试剂盒(D7190)。

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。

- qPCR检测推荐参考BeyoFast<sup>™</sup> SYBR Green qPCR Mix (2X) (D7501/D7503/D7507/D7260/D7262/D7265)，注意引物退火温度，建议根据引物Tm值调整退火温度，如果希望提高反应特异性，可提高退火温度。

- qPCR数据处理：根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 和 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 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)：

$\Delta C_t [RIP] = C_t [RIP] - (C_t [Input] - \log_2(\text{Input Dilution Factor}))$ ，Input Dilution Factor为Input组稀释倍数，即若最初保留的Input为30 $\mu$ l (一次RIP反应的10%蛋白裂解液)样品，则稀释倍数为10。

$$\% \text{Input} = 2^{-(\Delta C_t [RIP])}$$

$$\Delta\Delta C_t [RIP/IgG] = C_t [RIP] - C_t [IgG]$$

$$\text{RIP Fold enrichment} = 2^{-(\Delta\Delta C_t [RIP/IgG])}$$

举例：经qPCR测定，RIP阳性对照组(HuR)的Ct值为22.6、阴性对照IgG组的Ct值为29.7、Input组的Ct值为19.3，Input稀释倍数为10。

$$\text{则} \Delta C_t [HuR] = C_t [HuR] - (C_t [Input] - \log_2(\text{Input Dilution Factor})) = 22.6 - (19.3 - \log_2 10) = 6.62$$

$$\% \text{Input (HuR)} = 2^{-(\Delta C_t [HuR])} = 2^{-6.62} = 1\%$$

$$\Delta C_t [IgG] = C_t [IgG] - (C_t [Input] - \log_2(\text{Input Dilution Factor})) = 29.7 - (19.3 - \log_2 10) = 13.72$$

$$\% \text{ Input (IgG)} = 2^{(-\Delta\text{Ct}[\text{HuR}])} = 2^{-13.72} = 0.0074\%$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} [\text{HuR}/\text{IgG}] = 22.6 - 29.7 = -7.10$$

$$\text{Fold Enrichment of RNA (HuR/IgG)} = 2^{(-\Delta\Delta\text{Ct} [\text{HuR}/\text{IgG}])} = 2^{(-(-7.10))} = 137.2$$

#### 参考文献:

1. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Mol Cell Biol. 1999. 19(3):1720-30.
2. Tenenbaum SA, Carson CC, Lager PJ, Keene JD. Proc Natl Acad Sci USA. 2000. 97(26):14085-90.

#### 相关产品:

产品编号	产品名称	包装
P1801S	BeyoRIP™ RIP Assay Kit (Protein A/G 琼脂糖)	22 次
P1805S	BeyoRIP™ RIP Assay Kit (Protein A/G 琼脂糖磁珠)	22 次
P1821S	BeyoRIP™ Antibody and Primer Pair Kit for HuR RIP Assay	10 次
P2078	ChIP Assay Kit	22 次
P2080S	BeyoChIP™ ChIP Assay Kit (Protein A/G 磁珠)	22 次
P2083S	BeyoChIP™ Enzymatic ChIP Assay Kit (Protein A/G 磁珠)	22 次
GS606	化学发光法 RNA EMSA 试剂盒	100 次
GS002	EMSA/Gel-Shift 试剂盒	100 次
GS009	化学发光法 EMSA 试剂盒	100 次

Version 2023.12.20