GenSeq® RIP 试剂盒

GS-ET-006

Instruction Manual Version 2.3

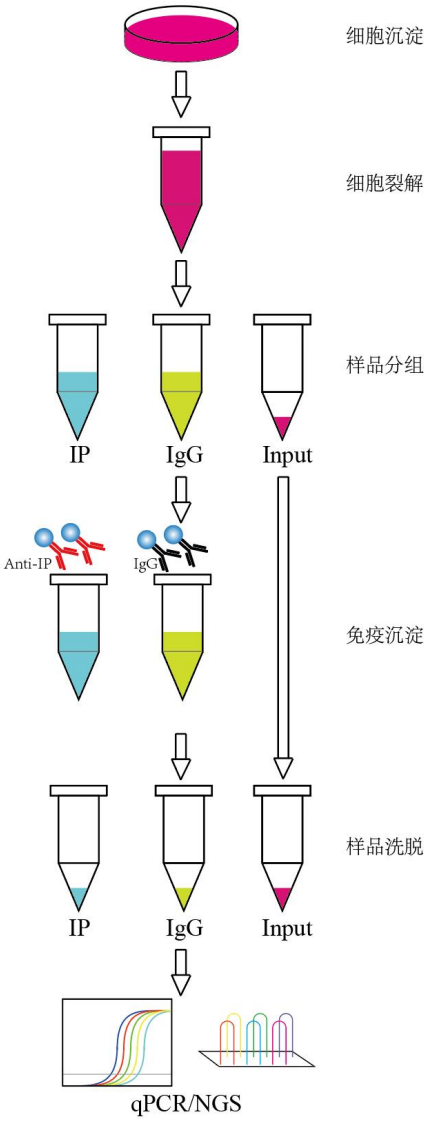
（Updated,Mar 2025）

产品简介

RNA Immunoprecipitation （RIP）是研究细胞内蛋白与RNA结合情况的技术，是研究转录后调控网络的有力工具。利用针对目标蛋白的特异性抗体，将目标蛋白及与之结合的RNA共沉淀下来，分离纯化后，就可以得到与目标蛋白结合的RNA。

GenSeq® RIP试剂盒专为RIP实验设计，包含了RIP流程中的所有核心试剂，具有更好的性价比。新研发的RNA纯化步骤在保证IP后RNA产量的同时减少实验时间。此外，试剂盒中包含了对照IgG抗体，便于用户进行实验质控，保证了实验的严谨性。优化过的实验流程极其简洁和高效，RIP实验后得到的RNA可以广泛应用于后续的定量RT-PCR（RIP-qPCR）、高通量测序（RIP-Seq）以及其它检测分析。

实验流程图



试剂盒组分 （ 12 次反应*）	体积	保存条件
RIP Lysis Buffer	1.4 mL	4℃
Protease Inhibitor	7 µL	-20℃
RNase Inhibitor	70 µL	-20℃
PGM Beads	630 µL	4℃
10 × RIP Wash Buffer	9 mL	4℃
IgG antibodies	20 µL	-20℃
0.5 M EDTA	460 µL	4℃
10% SDS	90 µL	4℃
Proteinase K	100 µL	-20℃
MS Beads	260 µL	4℃
Buffer RLT	4.6 mL	4℃
Nuclease Free Water	500 µL	4℃

*: 此规格试剂盒可用于 6 次 RIP 反应 + 6 次 IgG 反应

试剂盒组分 （ 24 次反应*）	体积	保存条件
RIP Lysis Buffer	2.8 mL	4℃
Protease Inhibitor	15 µL	-20℃
RNase Inhibitor	140 µL	-20℃
PGM Beads	1250 µL	4℃
10 × RIP Wash Buffer	18 mL	4℃
IgG antibodies	40 µL	-20℃
0.5 M EDTA	1 mL	4℃
10% SDS	180 µL	4℃
Proteinase K	200 µL	-20℃
MS Beads	520 µL	4℃
Buffer RLT	9 mL	4℃
Nuclease Free Water	500 µL	4℃

*: 此规格试剂盒可用于 12 次 RIP 反应 + 12 次 IgG 反应

试剂盒组分 （ 48 次反应*）	体积	保存条件
RIP Lysis Buffer	5.6 mL	4℃
Protease Inhibitor	30 µL	-20℃
RNase Inhibitor	280 µL	-20℃
PGM Beads	2.5 mL	4℃
10 × RIP Wash Buffer	36 mL	4℃
IgG antibodies	80 µL	-20℃
0.5 M EDTA	2 mL	4℃
10% SDS	360 µL	4℃
Proteinase K	400 µL	-20℃
MS Beads	1040 µL	4℃
Buffer RLT	18 mL	4℃
Nuclease Free Water	800 µL	4℃

*: 此规格试剂盒可用于 24 次 RIP 反应 + 24 次 IgG 反应

自备材料

- ✓ 磁力架（适配 1.5 mL EP 管）
- ✓ 移液枪及适配枪头（无核酸酶）
- ✓ 无核酸酶管（1.5 mL EP 管）
- ✓ 4 ℃离心机
- ✓ 旋转混匀仪或万向摇床
- ✓ 无水乙醇
- ✓ RIP Wash Buffer：用无核酸酶水将试剂盒自带的 10× RIP Wash Buffer 稀释10倍

实验步骤

1. 样品预处理

✧ 配置 Complete Lysis Buffer

根据 反应数，按下表配置合适体积的 Complete Lysis Buffer* ，混匀后冰上放置备用。

	× 1	× N
RIP Lysis Buffer	100 µL	100 µL × N
Protease Inhibitor	0.5 µL	0.5 µL × N
RNase Inhibitor	0.25 µL	0.25 µL × N

* ： 一般而言，每个 RIP 反应约需 100 µL Complete Lysis Buffer。

✧ 悬浮细胞

1) 取约1×10^7细胞在 4℃ 1000×g 离心 5 min，收集细胞沉淀，吸弃上清。
2) 用 1 mL 冰上预冷的 1 ×PBS 重悬细胞沉淀，4℃，1000×g 离心 5 min，小心吸弃上清。
3) 重复步骤（2）一次。
4) 根据反应数，用合适体积的Complete Lysis Buffer重悬细胞，轻轻吹散细胞，放置在冰上裂解 5 min， 转移至-80℃冻存。

✧ 单层细胞或贴壁细胞

1) 用10 mL冰上预冷的1× PBS 清洗培养皿或培养瓶中的细胞两次。
2) 加入10 mL 预冷 PBS后用细胞刮将细胞刮下来，收集至 EP管中。
3) 4℃，1000×g 离心 5 min，小心吸弃上清，收集细胞沉淀。
4) 根据反应数，用合适体积的Complete Lysis Buffer重悬细胞，轻轻吹散细胞，放置在冰上裂解 5 min， 转移至-80℃ 冻存。

✧ 组织样品

1) 取100 mg新鲜组织，在冰上预冷的1× PBS中洗涤组织以去除血液等杂质。
2) 将清洗后的组织转移至适量预冷的1× PBS 中，用匀浆器或其他细胞分离设备使组织分散为单个细胞。（注意：步骤（1-2）操作须迅速，尽量 5 min内完成，避免时间太久导致RNA降解）。
3) 4℃ ，1000×g 离心 5 min，弃上清，收集细胞沉淀。
4) 根据反应数，用合适体积的Complete Lysis Buffer重悬细胞，轻轻吹散细胞，放置在冰上裂解 5 min， 转移至-80℃冻存。

2. PGM 磁珠与抗体准备

5) 按反应数准备新的 1.5 mL EP 管，管上做好标记，如：样品名+抗体名。
6) 短暂振荡混匀 PGM Beads ，分别取 50 µL 至每个准备好的 EP 管中。
7) 每管加入 500 µL RIP Wash Buffer，短暂振荡混匀。
8) 将 EP 管置于磁力架上待溶液澄清（约2 min），小心吸弃上清，勿扰动磁珠。
9) 重复步骤 7）- 8）一次。
10) 每管加入100 µL RIP Wash Buffer 重悬 PGM Beads 磁珠，每管分别加入 3-5 µL对应的目标抗体（RIP 抗体或 IgG 抗体）。
11) 在旋转混匀仪或万向摇床上，室温混匀 30 min。
12) 短暂离心后，将 EP 管置于磁力架上待溶液澄清（约2 min），小心吸弃上清，勿扰动磁珠。
13) 每管加入500 µL RIP Wash Buffer，移液枪轻柔吹打混匀。
14) 将 EP 管置于磁力架上待溶液澄清（约2 min），小心吸弃上清，勿扰动磁珠。
15) 重复步骤 13）- 14）一次。
16) 将 EP 管从磁力架取下，加入 500 µL RIP Wash Buffer，移液枪轻柔吹打混匀后置于冰上备用。

3. RIP 反应

17) 根据反应数，按下表配置RIP Buffer：

RIP Buffer	× 1	× N
RIP wash Buffer	860 µL	860 µL × N
0.5M EDTA	35 µL	35µL × N
RNase Inhibitor	5 µL	5 µL × N

18) 将步骤 2 PGM 磁珠与抗体准备 12）中的 EP 管置于磁力架上待溶液澄清（约2 min），弃上清。
19) 将 EP 管从磁力架取下，每管加入 900 µL RIP Buffer，移液枪轻柔吹打混匀，置于冰上备用。
20) 将“样品预处理 ”中的样品从-80℃ 冰箱中取出，快速融化后，4℃，14000g 离心10 min，小心转移上清至新的 EP管中，勿扰动沉淀。
21) 针对每个样品：分别取 100 µL 上清到步骤3 RIP 反应 15） 结合了RIP 抗体或 IgG 抗体的磁珠中，每管终体积为1 mL（剩余上清可标记为“样品名，Input ”，保存于-80℃备用）。
22) 4℃ 旋转混匀仪或万向摇床上孵育 3 h 或过夜。

23) 短暂离心，将 EP 管置于磁力架上待溶液澄清（约2 min），弃上清。

24) 加入 500 μL冰上预冷的 RIP Wash Buffer 到磁珠中，移液枪轻柔吹打混匀。

25) 将 EP 管置于磁力架上待溶液澄清（约2 min），小心吸弃上清，勿扰动磁珠。

26) 重复步骤 20）- 21） 五次（即：用冷 RIP Wash Buffer 清洗磁珠共计 6 次）。

27) 根据反应数，按下表配置蛋白酶 K 缓冲液*：

试剂	× 1	× N
RIP Wash Buffer	46.8 μL	46.8 μL× N
10% SDS	6 μL	6 μL× N
Proteinase K	7.2 μL	7.2 μL× N
总	60 μL	60 μL× N

*：蛋白酶 K 缓冲液需提前配置，防止未加溶液的磁珠放置时间过长。

28) 分别用60 μL蛋白酶 K缓冲液重悬浮步骤3 RIP 反应 22）中的磁珠。

选做步骤：如果后续实验需要用到 Input 对照的话，将“ Input”样品从-80 ℃冰箱取出，解冻后取 10 μL到新的 EP管中，加入 60 μL 蛋白酶 K 缓冲液。

29) 55℃ 旋转混匀仪或万向摇床旋转孵育 45 分钟*。

*:实验过程中55℃旋转混匀仪或万向摇床旋转孵育45分钟此步骤没有对应的仪器可以替代的方法有三种：1.使用恒混混匀仪；2.放置在55℃烘箱中，每隔5min移液枪吹打混匀；3.放置在55℃水浴锅，每隔5min移液枪吹打混匀，使用此方法需要注意不要污染；在此步骤中磁珠未均匀分散在EP管中，对IP后RNA产率有一定影响。

4. RNA纯化

30) 准备MS Beads：

a. 用移液枪轻柔吹打混匀 MS Beads，按反应数准备新的1.5 mL EP管，分别取20 μLMS 磁珠到 EP 管中；

b. 将 EP 管置于磁力架上待溶液澄清（约2 min），用移液枪吸弃上清，勿扰动磁珠；

c. 将 EP 管从磁力架上取下，每管加入200 μL Buffer RLT，用移液枪轻柔吹打混匀；

d. 将 EP 管置于磁力架上待溶液澄清（约2 min），用移液枪吸弃上清，勿扰动磁珠；

e. 将 EP 管从磁力架上取下，每管加入150 μL Buffer RLT，重悬 MS Beads。

31) 将步骤3 RIP 反应 25）中的样品置于磁力架上待溶液澄清（约2 min），用移液枪转移 50 μL上清到 150 μL 准备好的 MS Beads中，移液枪轻柔吹打混匀*。

*：RNA 纯化过程中产生絮状物属于正常情况。

32) 加入200 μL无水乙醇，移液枪轻柔吹打混匀，室温孵育 5 min。

33) 将 EP 管放置在磁力架上待液体澄清（约2 min），移液枪吸弃上清，勿扰动磁珠。

34) 用无核酸酶水配置的75%乙醇漂洗 MS Beads：

a. 保持样品始终处于磁力架上，加入500 μL新鲜配制的75%乙醇漂洗磁珠 （注意不要吹散磁珠）室温孵育30 s，小心移除上清；

b.重复上述步骤（a）一次。

35) 室温干燥 2-5 min。

36) 加入11.25 μL Nuclease Free Water 重悬磁珠，室温孵育 2 min。

37) 将 EP 管置于磁力架上待溶液澄清（约 2 min），将10 μL的上清转移到新的EP 管中，RNA样品立即用于后续实验或-80°C保存待用。

相关产品：

试剂盒	货号	规格
GenSeq® m6A MeRIP Kit	GS-ET-001	12T、24T、48T
GenSeq® m1A MeRIP Kit	GS-ET-002	12T、24T、48T
GenSeq® m5C MeRIP Kit	GS-ET-003	12T、24T、48T
GenSeq® m7G MeRIP Kit	GS-ET-004	12T、24T、48T
GenSeq® ac4C IP Kit	GS-ET-005	12T、24T、48T
GenSeq® RIP Kit	GS-ET-006	12T、24T、48T
GenSeq® O8G IP Kit	GS-ET-007	12T、24T、48T
GenSeq® Ψ IP Kit	GS-ET-008	12T、24T、48T
GenSeq Hi-C Kit	GS-EG-003	6T
GenSeq® Co-Immunoprecipitation（CoIP） Kit	GS-EG-008	12T、24T
GenSeq® CHIRP Kit	GS-EG-009	12T、24T
GenSeq® RNA Pull Down Kit	GS-EG-010	12T、24T
GenSeq® RCA DNA Amplification Kit	GS-MB-002	25T、100T

上海云序生物科技有限公司

服务电话：021-64878766

网址：http://www.cloud-seq.com.cn

地址：上海市松江区漕河泾莘砖公路518号24号楼4楼