此为临时链接，仅用于预览，将在短期内失效。

# RNA 免疫沉淀 (RIP) 实验方案

abcam abcam 2018-08-23

**请关注：** ↑Abcam 助您更快实现研究使命

查找您进行 RIP 实验所需要的一切，包括一份正确试剂的列表以及实验方案每个步骤的疑难解答提示。

RIP 是一种基于抗体的技术，用于定位体内的 RNA-蛋白质相互作用。将所关注的 RNA 结合蛋白 (RBP) 与其结合的 RNA 一起进行免疫沉淀，鉴定结合转录RNA（mRNA、非编码 RNA 或病毒 RNA）。可以通过实时 PCR、微阵列或测序检测。

最近，表观遗传学和 RNA 生物学领域对不同 RNA 作用和功能的关注大大增加。据观察，RNA 的功能远不止转录和后续的翻译。例如，RNA-蛋白质相互作用能够调控 mRNA 和非编码 RNA 的功能。对 RNA 潜能的这一新认识带动了新方法的发展，使研究人员能够定位 RNA-蛋白质相互作用。RIP 是一种研究单个蛋白质和 RNA 分子间物理结合的实验方案。

下述 RIP 实验方案修改自 Khalilaet al.(2009)，Hendrickson et al.(2009)，Hendrickson et al.(2008) 和 Rinn et al.(2007)。

## 实验方案概述

1.收集细胞（使用甲醛选择性处理细胞，体内交联蛋白质-RNA 复合物）

2.分离细胞核，裂解细胞核沉淀

3.染色质片段化

4.将所关注的 RNA 结合蛋白（RBP）和结合的 RNA 一起进行免疫沉淀

5.洗去未结合的物质

此为临时链接，仅用于预览，将在短期内失效。

6.纯化免疫沉淀后 RBP 上结合的 RNA

7.将 RNA 逆转录为 cDNA，通过 qPCR、微阵列或测序进行分析

# RIP 实验方案

## 1 细胞收集

1.1.培养细胞至一定密度，按照实验要求进行处理。

1.2.如果需要进行交联步骤，则需要优化固定时间。

查看我们 ChIP 实验方案中的交联部分。

1.3.通过胰蛋白酶消化收集细胞并在 PBS（例如，107 个细胞使用 2 mL PBS）、新鲜制备的细胞核分离缓冲液 (2 mL) 和水 (6 mL) 中重新悬浮。冰上放置 20 分钟（不时搅拌）。

实验过程中应该保持有一个或多个阴性对照，例如无抗体的样品或敲除细胞或组织的免疫沉淀。不建议将敲低细胞用于阴性对照实验。

## 2 细胞核分离和裂解物沉淀

2.1. 2,500 g 离心 15 分钟沉淀细胞核。

2.2. 将细胞核沉淀重新悬浮于新鲜制备的 RIP 缓冲液 (1 mL) 中。

为避免污染，使用不含 RNA 酶的试剂，如不含 RNA 酶的枪头、试管和试剂瓶；同时使用不含 DNA 酶和 RNA 酶的超纯蒸馏水制备缓冲液和溶液。

## 3 染色质剪切

3.1.将重悬后的细胞核分成两份，每份 500 mL（用于模拟实验和 IP）。

3.2.使用杜恩斯匀浆器捣碎 15 - 20 次对染色质进行机械剪切。

针对不同的细胞系可能需要优化剪切条件。

3.3.13,000 rpm 离心 10 分钟沉淀细胞核膜和碎片。

在液氮中冷冻一份裂解物用于对照 RNA 分离。

## 4 RNA 免疫沉淀

4.1.将所关注的蛋白质的抗体 (2 - 10 µg) 加入上清液中 (6 - 10 mg)，4 oC 轻柔搅动孵育 2 小时（至过夜）。

4.2.加入protein A/G 磁珠 (40 µL)，4 oC 轻柔搅动孵育 1 小时。

此为临时链接，仅用于预览，将在短期内失效。

根据所关注的蛋白质和抗体，加入的抗体量和孵育时间可能需要进行优化。如果一种抗体可以用于IP，则表明它也可能用于RIP。

## 5　洗去未结合的物质

5.1. 2,500 rpm 离心 30 s 沉淀磁珠，移去上清液，在 500 mL RIP 缓冲液中重悬磁珠

对protein A/G 磁珠沉淀的严格清洗至关重要，并且可能需要优化。

5.2. RIP中重复清洗共三次，随后在 PBS 中清洗一次

第二次清洗后，将5%的磁珠进行冷冻，用于 SDS-PAGE 分析（例如，如果您的磁珠悬浮液总体积为 100 µL，则冷冻 5 µL 的磁珠悬浮液）。

## 6　对免疫沉淀后 RBP 上结合的 RNA 进行纯化

1.根据制造商的说明，在 TRIzol RNA 提取试剂 (1 mL) 中重悬磁珠，分离共沉淀的 RNA。在我们的 RNA 分离实验方案中可查看更多信息。

2.使用不含核酸酶的水（例如 20 µL）洗脱 RNA。

将约 15 – 25 µL（依产量而定）经 DEPC 处理的 TE 缓冲液或水加入 RNA 沉淀中。洗脱的 RNA 可储存于 -80 °C。

3.可以使用WB分析检测通过磁珠分离的蛋白质。可在我们的WB实验方案中查看更多信息。

如果进行了交联步骤 (1.2)，则此时应进行逆交联。请查看我们 ChIP 实验方案中的逆交联部分获取详细信息。

## 7　将 RNA 逆转录 (RT) 为 cDNA 并进行分析

1.根据制造商的说明，使用逆转录 DNA 酶处理 RNA。

2.如果靶标已知，使用 qPCR 分析 cDNA。如果靶标未知，可使用 cDNA 文库创建、微阵列和测序进行分析。

PCR 扩增之后对照实验不应该产生可检测的产物，且这些对照文库的高通量测序应该只返回非常少量的独有序列。

## 试剂

细胞核分离缓冲液

- 1.28 M 蔗糖

此为临时链接，仅用于预览，将在短期内失效。

- 40 mM Tris-HCl pH 7.5
- 20 mM $MgCl_2$
- 4% Triton X-100

RIP 缓冲液

- 150 mM KCl
- 25 mM Tris pH 7.4
- 5 mM EDTA
- 0.5 mM DTT
- 0.5% NP40
- 100 U/ml SUPERase•in™ RNA 酶抑制剂（每次新加入）
- 蛋白酶抑制剂（每次新加入）

## 参考文献


- Khalila AM, Guttman M, Huarte M, Garbera M, Rajd A, Morales DR, Thomas K, Pressera A, Bernstein BE, Oudenaarden AV, Regeva A, Lander ES, and Rinn JL (2009).Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression.PNAS 106, 11667–72.
- Hendrickson DG, Hogan DJ, McCullough HL, Myers JW, Herschlag D, Ferrell JE, and Brown PO (2009).Concordant Regulation of Translation and mRNA Abundance for Hundreds of Targets of a Human microRNA.PLoS Biology 7 (11), 2643.
- Hendrickson DG, Hogan DJ, Herschlag D, Ferrell JE, and Brown PO (2008).Systematic Identification of mRNAs Recruited to Argonaute 2 by Specific microRNAs and Corresponding Changes in Transcript Abundance.PLoS One3 (5), 2126.
- Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E, and Chang HY (2007).Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs.Cell 129, 1311–1323.