

# GenSeq® RIP 试剂盒

**GS-ET-006**

---

Instruction Manual Version 2.0

试剂盒组分 (12 次反应)	体积	保存条件
RIP Lysis Buffer	1.4 mL	4°C
10 x RIP Wash Buffer	9 mL	4°C
0.5 M EDTA	460 $\mu$ L	4°C
10% SDS	220 $\mu$ L	4°C
PC Buffer	440 $\mu$ L	4°C
PC Enhancer	14 $\mu$ L	-20°C
Protease Inhibitor	8 $\mu$ L	-20°C
Rnase Inhibitor	60 $\mu$ L	-20°C
Nuclease Free Water	180 $\mu$ L	4°C
PGM Beads	630 $\mu$ L	4°C
Proteinase K	250 $\mu$ L	-20°C

试剂盒组分 (24 次反应)	体积	保存条件
RIP Lysis Buffer	2.8 mL	4°C
10 x RIP Wash Buffer	18 mL	4°C
0.5 M EDTA	1 mL	4°C
10% SDS	440 µL	4°C
PC Buffer	900 µL	4°C
PC Enhancer	27 µL	-20°C
Protease Inhibitor	15 µL	-20°C
Rnase Inhibitor	130 µL	-20°C
Nuclease Free Water	400 µL	4°C
PGM Beads	1250 µL	4°C
Proteinase K	500 µL	-20°C

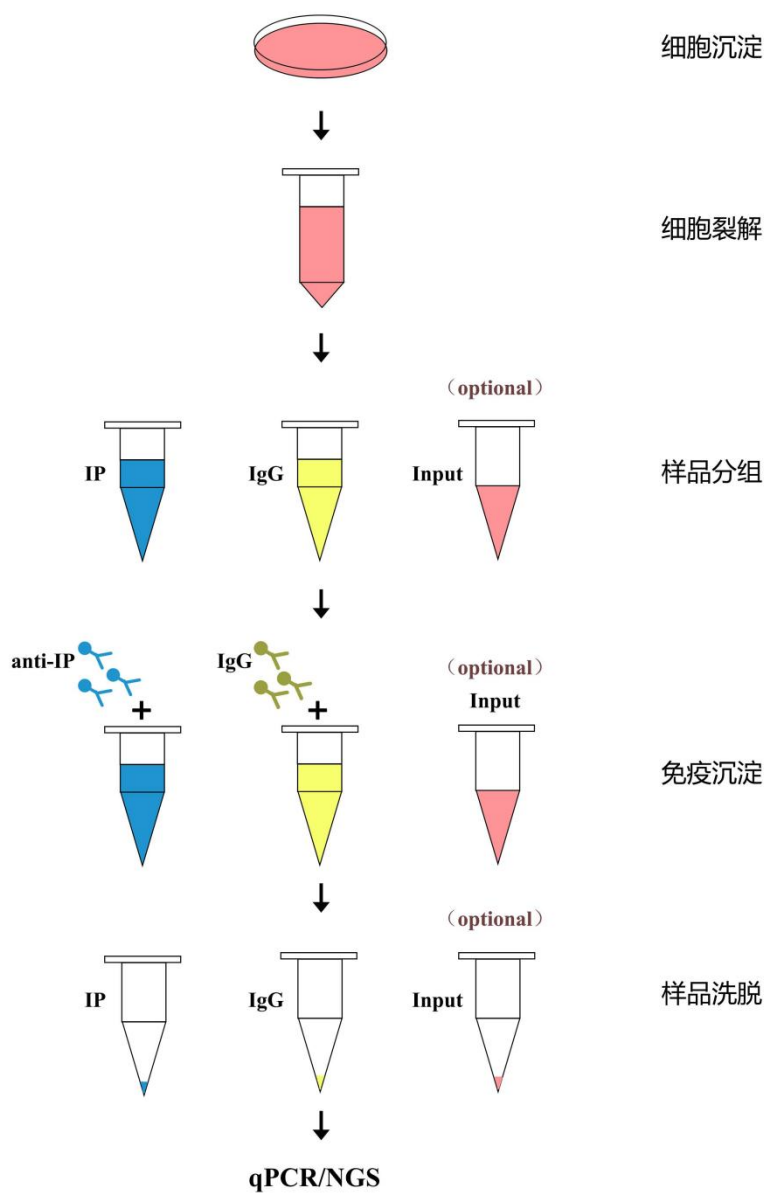
试剂盒组分 (48 次反应)	体积	保存条件
RIP Lysis Buffer	5.6 mL	4°C
10 x RIP Wash Buffer	35 mL	4°C
0.5 M EDTA	2 mL	4°C
10% SDS	880 µL	4°C
PC Buffer	1.8 mL	4°C
PC Enhancer	53 µL	-20°C
Protease Inhibitor	30 µL	-20°C
Rnase Inhibitor	240 µL	-20°C
Nuclease Free Water	800 µL	4°C
PGM Beads	2.5 mL	4°C
Proteinase K	1 mL	-20°C

## 自备材料

---

- ✓ 磁力架(适配1.5mL 管)
- ✓ 移液器及吸头(无核酸酶)
- ✓ 无核酸酶管 (1.5mL EP 管)
- ✓ 4 度离心机
- ✓ 旋转混匀仪或万向摇床
- ✓ 水浴锅
- ✓ 无水乙醇
- ✓ phenol:chloroform:isoamyl alcohol (125: 24: 1)
- ✓ 氯仿
- ✓ DEPC 水: 用于将试剂盒自带的10 × RIP Wash Buffer 稀释10 倍, 得到RIP Wash Buffer

## 实验流程图



## 实验步骤

---

### 1. 样品预处理

#### ❖ 配置 Complete Lysis Buffer

根据 RIP 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  $1 \times 10^7$  细胞在 4℃ 下  $1000 \times g$  离心 5 分钟，收集细胞沉淀，吸弃上清。
- (2) 用 1 mL 冰上预冷的  $1 \times$  PBS 重悬细胞沉淀，4℃ 下  $1000 \times g$  离心 5 分钟，小心吸弃上清；
- (3) 重复步骤 (2) 一次（即：用  $1 \times$  PBS 洗涤细胞沉淀总计 2 次）。
- (4) 用 250 μL Complete Lysis Buffer 重悬细胞，轻轻吹散细胞，放置在冰上裂解 5 分钟，转移至 -80 度冻存。

#### ❖ 单层细胞或贴壁细胞

- (1) 用 10 mL 冰上预冷的  $1 \times$  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)  $1000 \times g$ ，4℃ 离心 5 分钟，小心吸弃上清，收集细胞沉淀。
- (4) 用 250 μL Complete Lysis Buffer 重悬细胞，轻轻吹散细胞，放置在冰上裂解 5 分钟，转移至 -80 度冻存。

#### ❖ 组织样品

- (1) 取 100 mg 新鲜组织，在冰上预冷的  $1 \times$  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  $1 \times$  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 分钟内完成，避免时间太久导致 RNA 降解）
- (3)  $1000 \times g$ ，4℃ 离心 5 分钟，弃上清，收集细胞沉淀。
- (4) 用 250 μL Complete Lysis Buffer 重悬细胞，轻轻吹散细胞，放置在冰上裂解 5 分钟，转移至 -80 度冻存。

## 2. PGM 磁珠与抗体准备

- (1) 按 RIP 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。
- (2) 短暂振荡混匀 PGM Beads 磁珠，分别取 50  $\mu$ L 至每个准备好的 EP 管中。
- (3) 每管加入 500  $\mu$ L RIP Wash Buffer，短暂振荡混匀。
- (4) 将管子置于磁力架上约2 分钟至液体澄清，小心吸弃上清，勿扰动磁珠。
- (5) 重复步骤（3）—（4）一次。
- (6) 每管加入 100  $\mu$ L RIP Wash Buffer 重悬 PGM Beads 磁珠，各管分别加入 5  $\mu$ g 对应的目标抗体（RIP 抗体或 IgG 抗体）。
- (7) 在旋转混匀仪或万向摇床上，室温轻柔混匀 30 分钟。
- (8) 短暂离心后，将管子置于磁力架上约2 分钟至液体澄清，小心吸弃上清，勿扰动磁珠。
- (9) 每管加入 500  $\mu$ L RIP Wash Buffer，涡旋振荡混匀。
- (10) 将管子置于磁力架上约2 分钟至液体澄清，小心吸弃上清，勿扰动磁珠。
- (11) 重复步骤（9）—（10）一次。
- (12) 将管子从磁力架取下，加入 500  $\mu$ L RIP Wash Buffer，短暂振荡混匀后置于冰上备用。

## 3. RIP 反应

- (1) 根据 RIP 反应数，按下表准备 RIP Buffer:

RIP Buffer	$\times 1$	$\times N$
RIP wash Buffer	860 $\mu$ L	860 $\mu$ L $\times N$
0.5M EDTA	35 $\mu$ L	35 $\mu$ L $\times N$
Rnase Inhibitor	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L $\times N$

- (2) 将步骤 2（12）（见“PGM 磁珠与抗体准备”）中的离心管置于磁力架约2 分钟，弃上清；
- (3) 将磁珠从磁力架取下，每管加入 900  $\mu$ L RIP Buffer，短暂振荡混匀后置于冰上备用；
- (4) 将“样品预处理”中的样品从-80 度冰箱中取出，快速融化后4 $^{\circ}$ C，14,000g 离心 10 分钟，小心转移上清至新的 EP 管中，勿扰动沉淀。
- (5) 针对每个样品：分别取 100  $\mu$ L 上清到本节步骤（3）中结合了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 度备用）
- (6) 将步骤（5）中含有磁珠的 EP 管转移到旋转混匀仪或万向摇床上，4 $^{\circ}$ C 旋转混匀 3 小时或过夜；
- (7) 短暂离心，置于磁力架上约2 分钟，弃上清；
- (8) 加入 500  $\mu$ L 冰上预冷的 RIP Wash Buffer 到磁珠中，短暂震荡混匀；



- (9) 置于磁力架上约2 分钟，小心吸弃上清，勿扰动磁珠。
- (10) 重复 5 次步骤 (8) – (9) (即：用冷 RIP Wash Buffer 清洗磁珠共计 6 次)。

#### 4. RNA 纯化

(1) 准备蛋白酶 K 缓冲液，每个 IP 反应准备 150  $\mu\text{L}$  缓冲液。按如下顺序依次加入：

试剂	$\times 1$	$\times N$
RIP Wash Buffer	117 $\mu\text{L}$	117 $\mu\text{L} \times N$
10% SDS	15 $\mu\text{L}$	15 $\mu\text{L} \times N$
Proteinase K	18 $\mu\text{L}$	18 $\mu\text{L} \times N$
总计	150 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L} \times N$

(2) 分别用 150  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K 缓冲液重悬浮步骤 3 (10) (见“RIP 反应”)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 度冰箱取出，解冻后取 10 $\mu\text{L}$  到新的 EP 管中，加入 150 $\mu\text{L}$  蛋白酶 K 缓冲液。

- (3) 55 度水浴 1 小时(每隔 10 分钟拿出来震荡混匀一下)；
- (4) 短暂离心，将离心管置于磁力架上约2 分钟，将上清转移到新的离心管中；
- (5) 每管分别加入 250  $\mu\text{L}$  RIP Wash Buffer；
- (6) 加 400  $\mu\text{L}$  phenol:chloroform:isoamyl alcohol (125: 24: 1) ,震荡混匀 15 秒，室温 14,000g 离心 10 分钟；
- (7) 转移约 350  $\mu\text{L}$  上层液相到新的离心管中，加入 400  $\mu\text{L}$  氯仿，震荡混匀 15 秒，室温 14,000g 离心 10 分钟；
- (8) 小心地转移 300  $\mu\text{L}$  上层液相到新的离心管；
- (9) 加 33  $\mu\text{L}$  PC Buffer，1  $\mu\text{L}$  PC Enhancer，850  $\mu\text{L}$  无水乙醇，混匀后-80 度沉淀 1 小时或过夜；
- (10) 4 度，14,000g 离心 30 分钟，小心吸弃上清，保留沉淀；
- (11) 加入 1 mL 80%乙醇洗涤沉淀，14000g，4 度离心 15 分钟。
- (12) 小心吸弃上清，打开管盖，室温风干约 5 分钟 (Note: 风干时间不要过长)
- (13) 用 12  $\mu\text{L}$  Nuclease Free Water 溶解沉淀，取 1  $\mu\text{L}$  Nanodrop 定量，剩余 RNA 立即用于后续实验或尽快-80 度保存。