

细胞 RNA 免疫沉淀

RNA Immunoprecipitation (RIP)

李瑞花, 瞿蕾, 陈怡珺, 林爱福*

生命科学学院遗传与再生研究所, 浙江大学, 杭州市, 浙江省

*通讯作者邮箱: linaifu@zju.edu.cn

引用格式: 李瑞花, 瞿蕾, 陈怡珺, 林爱福. (2021). 细胞 RNA 免疫沉淀. *Bio-101* e1010808. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010808.

How to cite: Li, R. H., Qu, L., Chen, Y. J. and Lin, A. F. (2021). RNA Immunoprecipitation (RIP). *Bio-101* e1010808. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010808. (in Chinese)

摘要: RIP (RNA Immunoprecipitation, RNA 免疫沉淀) 技术, 是研究细胞内 RNA 与蛋白质结合情况的一种技术, 运用针对目标蛋白的抗体把相应的 RNA-蛋白复合物沉淀下来, 然后经过分离纯化获得结合在蛋白复合物上的 RNA。结合的 RNA 序列可通过 microarray、RT-qPCR 或高通量测序鉴定。RIP 技术不同于 ChIP 技术, 它是研究目的蛋白和 RNA 分子间物理结合的一种方法。根据实验样品是否交联, 将该技术分为两大类: 天然 RIP (Native RNA Immunoprecipitation) 和交联 RIP (Cross-linked RNA Immunoprecipitation)。该方法简单易操作, 结合 RNA pull-down 实验可以正向和反向的验证 RNA-蛋白质之间的相互作用。

关键词: RNA 蛋白质结合, 免疫沉淀, RNA 分离纯化

材料与试剂

1. 1.5 ml 离心管 (上海生工生物, catalog number: F601620-9001)
2. 2 ml RNase-free 离心管 (生工, catalog number: F601620-9001)
3. 1 ml RNase-free 枪头 (KIRGEN, catalog number: KG1333)
4. RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific™, catalog number: EO0382)
5. cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche, catalog number: 04693124001)
6. Phosphatase Inhibitor Cocktail (ApexBio, catalog number: K1014)

7. Pierce™ Protein A/G Plus Agarose (Thermo Scientific™, catalog number: 20423)
8. Primary antibody (根据实验需求, 选择)
9. TRIzol™ Reagent (Invitrogen™, catalog number: 15596018)
10. Superase.IN (Invitrogen™, catalog number: AM2694)
11. GlycoBlue (Invitrogen™, catalog number: AM9516)
12. Proteinase K (Invitrogen™, catalog number: 25530015)
13. 水饱和酚 (Invitrogen™, catalog number: AM9710)
14. 氯仿 (国药, catalog number: 10006818)
15. 无水乙醇 (国药, catalog number: 10009218)
16. 异戊醇 (国药, catalog number: 10003218)
17. IgG (CST, 根据一抗来源)
18. Tris (生工, catalog number: A501492-0005)
19. NaCl (生工, catalog number: A501218-0001)
20. MgCl₂ (国药, catalog number: 10012818)
21. NP-40 (生工, catalog number: A100109-0100)
22. SDS (麦克林, catalog number: 151-21-3)
23. Sodium deoxycholate (sigma, catalog number: 30970-25G)
24. Na₂HPO₄·12H₂O (国药, catalog number: 10020318)
25. KH₂PO₄ (生工, catalog number: A100781-0500)
26. 醋酸钠 (生工, catalog number: A110530-0500)
27. DEPC (Sigma, catalog number: D5758-25ML)
28. 1x RIPA 裂解液 (见溶液配方)
29. Proteinase K buffer (见溶液配方)
30. NT2 buffer (见溶液配方)
31. 10x PBS (见溶液配方)

仪器设备

1. 15 cm 细胞培养皿 (Excell, catalog number: CS016-0129)
2. 细胞刮刀 (阿拉丁, catalog number: C6587-01-10A)
3. -80 °C 冰箱

4. 小型低温离心机
5. Thermomixer
6. 移液器
7. 旋转仪
8. Vortex

实验步骤

一、准备样品

1. 取一盘 15 cm 培养皿培养的 MDA-MB-231 细胞 (细胞密度约 80%-90%), 用移液器吸去培养液, 放置于冰上, 加入 5 ml 冰冷的 1x PBS, 轻轻晃动, 用移液枪吸去 1x PBS。
2. 加入 2 ml 冰冷的 1x PBS, 用细胞刮刀将细胞刮下来, 并转移到 2 ml 离心管中。在 4 °C 2,500 rpm 的条件下离心 5 min, 用移液枪吸出上清。
3. (可选择) 将细胞在液氮中短暂冷冻后, 保存于 -80 °C 冰箱中。

二、裂解细胞

1. 往细胞中加入 1.5 ml 1x RIPA 裂解液 (加入 50 U/ml RiboLock RNase Inhibitor、50 U/ml Superase.IN、1x Protease Inhibitor Cocktail 和 1x Phosphatase Inhibitor Cocktail), 轻轻吹打重悬细胞, 冰上孵育 20 min, 在 4 °C 12,000 rpm 的条件下离心 15 min, 取上清于新的 2 ml 离心管中。
2. 取 10 μ l 蛋白裂解液标记“Input”, 存放在 -80 °C 冰箱中直到进行第四步实验时取出, 与 IP 样品同步进行 RNA 纯化实验。
3. (可选) 取 10 μ l 的蛋白裂解液用于 Western blot。

三、免疫沉淀

1. 将剩余蛋白裂解液均分成两份, 每份 740 μ l。一份加入适量蛋白抗体, 另一份加入等量的 IgG 作为阴性对照, 在 4 °C 旋转孵育 4 h。
2. 取 60 μ l Protein A/G PLUS-Agarose beads, 1 ml NT2 buffer 旋转洗涤 10 min, 在 4 °C 3,000 rpm 的条件下离心 5 min, 重复洗涤 3 次。

3. 将 beads 均分成两份，每份 500 μ l，去掉上层的 NT2 buffer，分别将与抗体孵育的细胞裂解液加入到 beads 中，在 4 $^{\circ}$ C 旋转孵育过夜。
4. 洗涤 beads。
 - 4.1 在离心管中加入 1 ml NT2 buffer，4 $^{\circ}$ C 旋转洗涤 5 min，在 4 $^{\circ}$ C 3,000 rpm 的条件下离心 5 min 去掉上清液。
 - 4.2 重复上述步骤 2 次。
 - 4.3 (可选) 在最后一次洗涤 beads 时，在离心管中加入 1 ml NT2 buffer，取出 1/15 体积 beads 于新的离心管中用于 Western blot 检测。

四、蛋白酶 K 消化

1. 准备 proteinase K buffer

每个样品中加入 150 μ l proteinase K buffer: 117 μ l NT2 buffer, 15 μ l 10% SDS, 18 μ l 10 mg/ml proteinase K。

2. 将步骤三中的 beads，在 4 $^{\circ}$ C 3,000 rpm 的条件下，离心 5 min，吸去上清液，每个样品中加入 150 μ l proteinase K buffer 重悬 beads，将样品放在 Thermomixer 中 1,000 rpm，55 $^{\circ}$ C 反应 30 min，消化蛋白。
3. 将样品放入 4 $^{\circ}$ C 离心机中，在 3,000 rpm 条件下，离心 5 min，上清液转移到新的 1.5 ml 离心管中，加入 250 μ l NT2 buffer，至样品总体积为 400 μ l。

五、酚氯仿抽提 RNA

1. 加入 400 μ l 苯酚:氯仿:异戊醇 (125:24:1) 混合液，vortex 震荡 15 s，14,000 rpm 室温离心 10 min。
2. 上层水相 (约 350 μ l) 转移到新的 1.5 ml 离心管中，加入等体积的氯仿，vortex 震荡 15 s，14,000 rpm 室温离心 10 min。
3. 上层水相 (约 300 μ l) 转移到新的 1.5 ml 离心管中，加入 0.5 μ l GlycoBlue，混匀；加入 1/10 体积的醋酸钠，混匀；再加入 2.5 倍体积的无水乙醇，混匀，-80 $^{\circ}$ C 冰箱中沉淀 1 h 或者 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中沉淀过夜。
4. 在 4 $^{\circ}$ C 14,000 rpm 条件下离心 30 min，弃掉上清。
5. 用 80% 的乙醇洗涤 RNA 沉淀，在 4 $^{\circ}$ C 14,000 rpm 条件下离心 15 min，弃掉上清，

室温放置待乙醇完全挥发。

- 加入 20 μ l DEPC 水溶解 RNA，存放在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中，或者进行反转录实验、RT-qPCR 检测。

溶液配方

- NT2 buffer
 - 50 mM Tris-HCl pH7.5
 - 150 mM NaCl
 - 1 mM MgCl_2
 - 0.05% NP-40
- 1x RIPA Buffer
 - 0.5% sodium deoxycholate
 - 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
 - 150 mM NaCl
 - 1% NP-40
 - 0.1% SDS
- 10x PBS buffer
 - NaCl 40 g
 - KCl 1 g
 - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 17.9 g
 - KH_2PO_4 1.35 g
 - 水定容至 500 ml

注：本实验中所有试剂均为用 DEPC 处理水配制，用到的仪器均用 RNaseZap 湿巾擦拭；实验操作过程中，戴一次性口罩、帽子、手套，避免 RNase 污染。

致谢

我们感谢中国自然科学基金 (81672791, 81872300) 和浙江省杰出青年自然科学基金 (LR18C060002) 对我们实验工作的支持，同时也感谢实验室各位成员之间在科研工作中的密切协作和配合，使得我们的实验能够顺利，稳定进行。