

## CHIRP-阳性试剂盒说明书

**产品货号:** KT105-02

**产品简介:** CHIRP 是一种检测体内与 RNA 绑定的 DNA 和蛋白相互作用的方法，可同时分析 lncRNA/circRNA、蛋白及 DNA 三者互作关系。本产品适用于大部分的动物细胞和组织的 CHIRP 实验。

**试剂盒包装组分:** 本试剂盒包含 12 个反应。

表 1 试剂盒包装组分信息

4℃室温保存试剂		
试剂	编号	数量
Cell lysis buffer	SCCHR-1	25mL
Hybridization buffer	SCCHR-2	25mL
Wash buffer	SCCHR-3	65 mL
PK buffer	SCCHR-4	1.5 mL
DNA elution buffer	SCCHR-5	1.5 mL
Proteinase K	SCCHR-6	200uL
链霉亲和素磁珠	SCCHR-7	1.5 mL
-20℃保存试剂		
蛋白酶抑制剂	SCCHR-8	100uL
PMSF	SCCHR-9	100uL
RNase inhibitor	SCCHR-10	100uL
阳性对照体系：(-20℃保存)		
阳性对照探针 TERC (100pmol/u1)	SCCHR-12	15 uL
阴性对照探针 LacZ (100pmol/u1)	SCCHR-13	15 uL
阳性对照抗体 TCAB1 (abcam, ab99376)	SCCHR-14	10 uL, 足够检测 4-5 个 Western blots
RNA q-pcr 阳性检测引物 TERC (F/R)	SCCHR-15	各 50 uL (10uM)
RNA q-pcr 阴性检测引物 GAPDH (F/R)	SCCHR-16	各 50 uL (10uM)
端粒 DNA Southern 检测探针	SCCHR-17	10 uL
Alu DNA Southern 检测探针	SCCHR-18	10 uL

### 阳性对照体系说明:

图 1 显示了来自 HeLa 细胞的人端粒酶 RNA (TERC) 相对于 GAPDH 的富集, GAPDH 是用作阴性对照的丰富细胞 RNA。通过进行 ChIRP 来降低细胞中存在的大多数 TERC RNA (~88%), 而仅回收 0.46% 的 GAPDH RNA, 表明富集因子为~200 倍。非特异性探针, 例如靶向 LacZ RNA 的探针, 其在哺乳动物细胞中不表达 (图 1), 可用作另外的阴性对照。

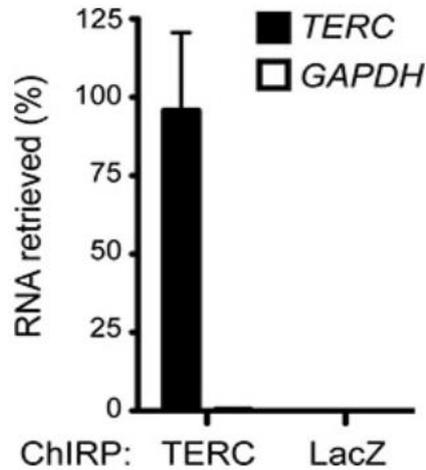


图1 q-pcr 检测 TERC 探针富集目标 RNA 效率

TERC RNA 是端粒酶的一个组成部分，由端粒酶 RNA 基因 (TERC) 编码，它与端粒 DNA 结合互动，使用标记的 Southern 探针检测端粒 DNA 和 Alu 重复序列进行 Dot blot 的 Southern 杂交检测（图 2）端粒 DNA 与 TERC RNA 的结合。

Southern 探针序列：

Telomere: CCCTAACCTAACCTAACCTAACCTAACCTAA

Alu: GTGATCCGCCCGCCTCGGCCTCCCAAAGTG

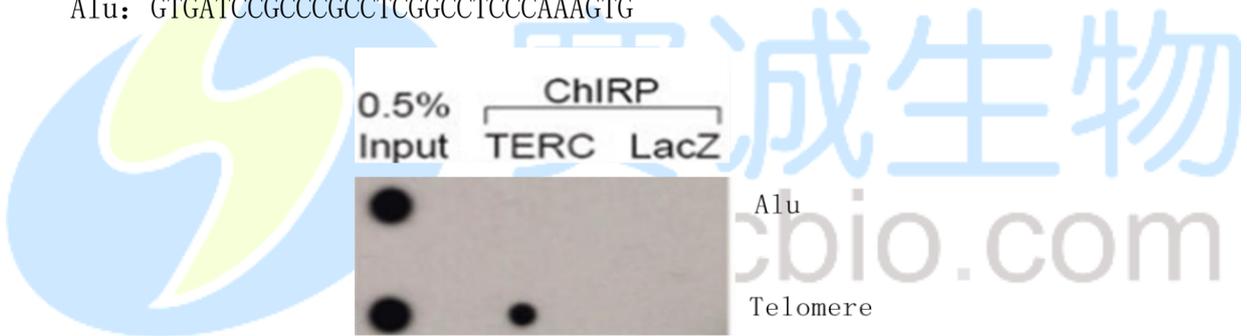


图2 Southern blot 检测端粒 DNA 与 TERC RNA 的结合

蛋白 TCAB1 是已知的端粒酶 holocomplex 伴侣蛋白，图 3 表明 TERC RNA 富集 TCAB1 蛋白。

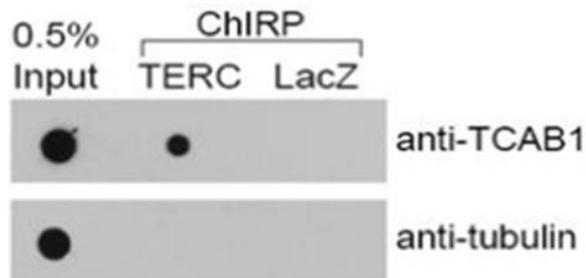


图3 dot blot 检测 TERC 富集的 TCAB1

### 实验过程摘要:

染色质在体内与 lncRNA: 蛋白质加合物交联。将生物素化的探针与靶 lncRNA 杂交，并使用磁性链霉抗生物素蛋白珠纯化染色质复合物，然后进行严格的洗涤。用 RNase A 和 H 的混合物洗脱了 lncRNA 结合的 DNA 或蛋白质。

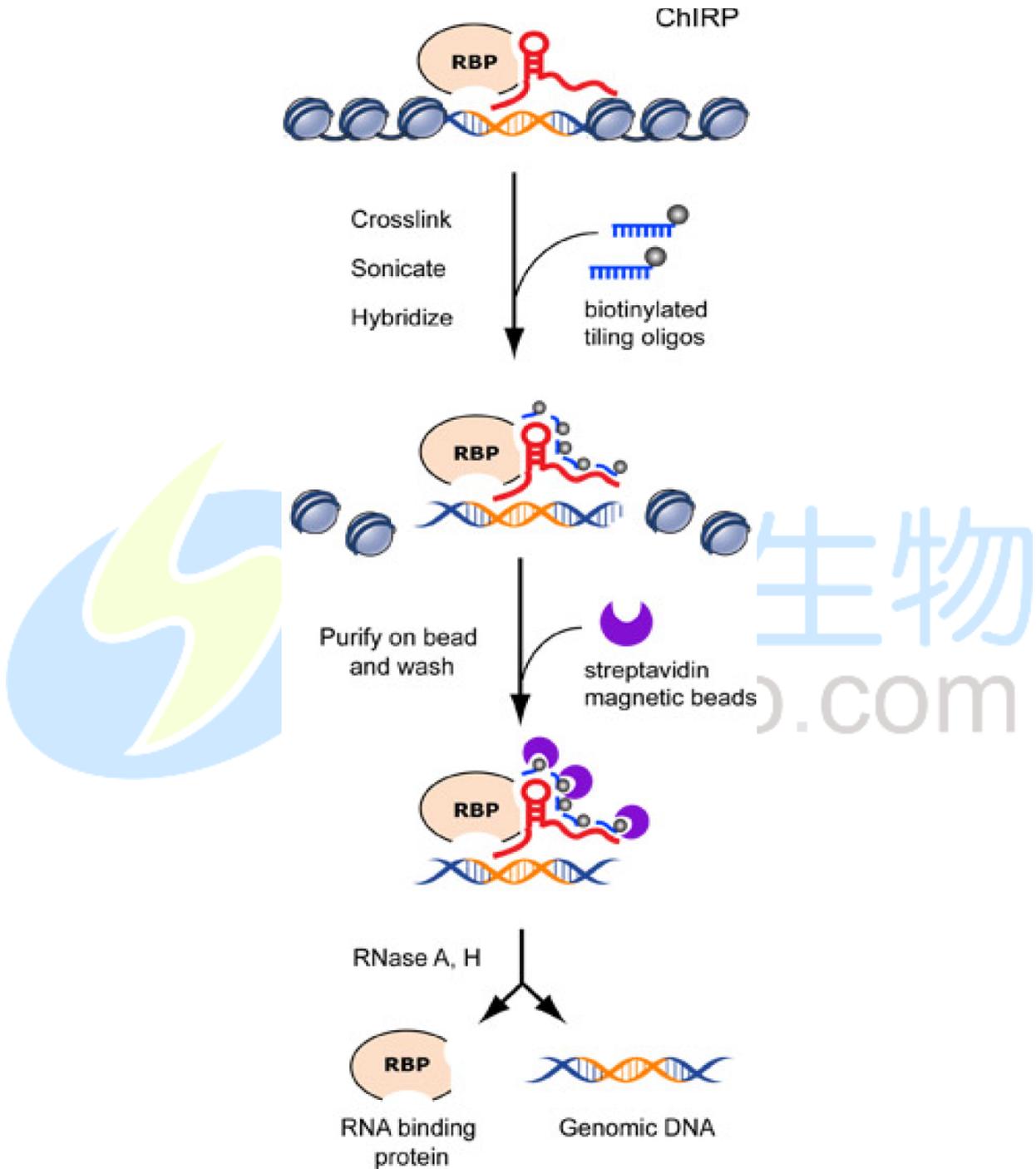


图 4 ChIRP 实验流程图

### 注意事项:

- 1 室温保存的试剂(Proteinase K 除外)如果出现沉淀,先在 37°C 加热溶解混匀后使用
- 2 蛋白酶抑制剂要在使用前再加入细胞裂解液中
- 3 磁珠不要冰冻,操作过程中不要剧烈吹打磁珠,控制孵育时间和清洗条件
- 4 实验环境为 Nuclease-free 环境,全过程须使用无 RNase 污染的实验用具和试剂,操作过程中也要防止 RNase 污染
- 5 抽提 RNA 过程中,要小心吸取上清,避免吸到下层有机相,乙醇沉淀 RNA 后要小心移除上清,防止 RNA 丢失
- 6 阳性对照蛋白产物点膜 WB 检测的样品要使用不含甘油的 loading buffer,否则不容易吸附在膜上。也可以按常规的 WB 方法进行检测。

### 需要的额外材料:

生物素标记的目标 RNA 反向序列 DNA 探针

戊二醛

甘氨酸

RNase R(去除线性 RNA)

RNase A

RNase H

DNA 纯化试剂盒

RNA 逆转录试剂

Southern 杂交试剂

旋转仪

TBS-T

Western blotting 试剂

Nitrocellulose 或 PVDF 膜

二抗

化学发光底物

电泳仪等

磁力架

## 实验步骤

### A 细胞交联

- 1、细胞计数后过夜培养至细胞贴壁,细胞数不少于  $2 \times 10^7$  个。
- 2、于细胞培养基中加入甲醛或者戊二醛(不含甲醇),至其终浓度为 1%,轻轻晃动,使液体均匀,于通风厨中室温孵育 10min。如果是悬浮细胞,需旋转交联,防止细胞聚团。
- 3、加入 1/10 体积的 10x 甘氨酸终止液(10x 甘氨酸终止液为 1.25M 甘氨酸)到交联体系中,于通风厨中室温孵育 5min,终止交联反应。
- 4、通风厨中吸除培养基,用预冷的 PBS 洗细胞两次。
- 5、加入预冷 PBS 刮下细胞,吸入 1.5ml 预冷的离心管中,3000g 离心 2min,弃掉上清液。  
(或用 1%胰酶消化,胰酶消化需用 PBS 再清洗细胞 2-3 次)

**注:** 如果实验不需要获取 DNA 产物,仅获取 RNA 和蛋白的可不进行交联。直接收集细胞进行后续的裂解过程。

## B 细胞裂解与染色体超声断裂

在交联的细胞中加入 1mL 含有蛋白酶抑制剂和 RNA 酶抑制剂（即每 mL 加入 12uL PMSF, 10uL 蛋白酶抑制剂和 5uL RNase inhibitor）的 Lysis Buffer，涡旋震荡 15s，然后进行超声处理使染色体断裂为 100–500bp 左右的片段。1, 2000rpm 4°C 离心 15min 后取上清至新的 EP 管中。

（**超声条件：**4°C 水浴中以最高设置进行超声处理，按不同超声仪要求可能需要将样本分成多管进行超声，30s on, 60s off，通常 bioruptor 水浴超声仪进行超声细胞样品约超声 10–20min，不同样本的超声时间不同，建议超声梯度为 5–10–15–20min）

**注：**如果实验不需要获取 DNA 产物，仅需要获取 RNA 和蛋白的话，超声的目的是把细胞充分裂解，只需将液体从粘稠变成不粘稠即可，一般使用探头类的超声仪超声 2–3 次，每次 3 秒，其他类型的超声仪视情况而定。如果目的 RNA 为环状 RNA 可用 RNase R 处理细胞裂解物去除线性 RNA 以提高环状 RNA 的获取率，RNase R 的使用条件需要自己摸索。

## C 探针制备

按每 100nt 左右一个探针，合成与目的 RAN 序列互补的带生物素标记的 DNA(20bp)探针。然后将一个基因的多个探针混合使用，环状 RNA 探针则是环状节点位置的 20bp 反向互补 DNA 序列探针。

## D 染色质免疫沉淀

1、取上述步骤所得裂解物上清液 500μl 至 1.5ml 离心管，储存于 -20°C，此为 Input。

2、取上述步骤所得裂解物上清液 500μl 至 1.5ml 或 2ml 的离心管中，加入 2 倍体积（即 1mL）的 Hybridization buffer，再加入 5uL RNase inhibitor，并按每 mL 裂解液加入 100pmol（约 500~600ng）探针的量加入标记的 DNA 探针，于 37°C 旋转孵 4h。

Positive control IP: 端粒酶 RNA——TERC 探针。

Negative control IP: LacZ 探针。

3、在探针与裂解液孵育将近 4h 后进行磁珠预处理，即每个 IP 组取 100uL 链霉亲和素磁珠只离心管中，于磁力架上静置直到磁珠完全吸附到管壁上，吸除上清，再用 Lysis Buffer 洗磁珠 2 次，吸除上清备用。

4、探针与裂解液孵育 4h 后，转移至处理好的磁珠管中，37°C 旋转孵 30min。

5、短暂离心后置于磁力架上，待溶液澄清后，弃掉上清。

6、加入 1ml Wash Buffer 在 37°C 旋转洗 5min，后置于磁力架上，待溶液澄清后，弃掉上清液。重复清洗 5–6 次。

7、清洗好的磁珠每个 IP 组取 1/10–1/5 磁珠于新 EP 管中用于提取 RNA，剩下的用于提取 DNA 或蛋白。Input 组取等等比例量提取 RNA。

（若后续的产物目的是检测 RNA 则全部用于提取 RNA。）

## E RNA、DNA 和蛋白的洗脱

磁珠分为 3 部分分别用于提取 RNA、DNA 和蛋白。

1、**RNA 洗脱：**（1）向磁珠中加入 50uL PK buffer 和 0.2U/uL Proteinase K（5uL），于 65°C 孵育 45min，然后 95°C 孵育 5min 使 DNA 探针与目的 RNA 分开，迅速置于冰上，加入 500uL 的 TRIZOL 溶液涡旋振荡 10s，室温静置 10min；input 组直接加入 500uL RIZOL 溶液提取 RNA。

（2）再加入 100 μL 氯仿，涡旋振荡 10s，在 4°C，12000rpm 离心 15min 后小心吸取上层水相至新的离心管中；

（3）加入 2.5 倍体积无水乙醇混匀（可选择加入 1–2uL 糖原）后置于 -80°C 沉淀过夜。

（4）第二天取出在 4°C，12000rpm 离心 15min 后小心去除上清，然后用 75% 乙醇清洗沉淀 3 次，最后一次尽量完全去除上清，开盖晾干 3min 左右，用 15uL RNase-free H<sub>2</sub>O 溶解。

提取的 RNA 经逆转录后 q-pcr 检测证明 ChIRP 探针对目标 lncRNA 的正确结合及有效捕获。

2、**DNA洗脱**：向磁珠中加入100ul DNA elution buffer, 100ug/ml RNase A和0.1U/ul RNase H, 于37℃孵育30min, 后加入0.2U/ul Proteinase K(10uL), 于65℃孵育45Min, 然后用DNA纯化试剂盒提取DNA或用酚氯仿抽提, DNA产物可用于q-pcr检测或测序。

**酚氯仿抽提 DNA 方法**：(饱和酚：氯仿：异丙醇=25:24:1)

为了减少 DNA 产物损失, 可以在蛋白酶 K 消化完之后再补充加入 200uL Elution buffer 之后再离心转移上清到新离心管中。

(1) 上清中加入等体积的酚氯仿抽提混合液, 涡旋振荡 10s 混匀, 然后静置 5min, 再 1,2000rpm 离心 15min。

(2) 离心后小心吸取上层水相至新的离心管中, 加入 2.5 倍体积的无水乙醇混匀, 放在 -20 摄氏度过夜沉淀 DNA。

(3) 第二天1,2000rpm离心15min后小心去除上清, 再用75%乙醇重复洗沉淀3次, 尽量完全去除上清, 开盖晾干 (约3min), 加入15至20uL水溶解产物。

3、**蛋白的洗脱**：向磁珠中加入50ul DNA elution buffer, 100ug/ml RNase A和0.1U/ul RNase H, 于37℃孵育30min, 后加入10U 5x蛋白Loading buffer, 100℃煮10min后离心取上清于新的EP管中即为蛋白产物。蛋白产物可用于银染, 质谱或WB检测。

**阳性对照体系产物检测方法**：

- 1、RNA检测：Q-PCR, 根据实际所用的q-pcr试剂盒说明。
- 2、蛋白检测：WB检测蛋白产物。
- 3、DNA检测：Southern blot。

