

CHIRP 试剂盒说明书

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。本试剂盒包含 20 个反应

试剂盒包装组分:

表 1 试剂盒包装组分信息

4℃保存试剂		
试剂	编号	数量
Cell lysis buffer	SCCHR-1	10mL
Hybridization buffer	SCCHR-2	50mL
Wash buffer	SCCHR-3	130 mL
链霉亲和素磁珠	SCCHR-4	2 mL
PK buffer	SCCHR-5	1.5 mL
DNA elution buffer	SCCHR-6	2 mL
-20℃保存试剂		
蛋白酶抑制剂	SCCHR-7	200uL
2x Loading buffer(无溴酚蓝)	SCCHR-8	150uL
RNase inhibitor	SCCHR-9	100uL
Proteinase K	SCCHR-10	100uL
RNase A	SCCHR-11	30uL
RNase H	SCCHR-12	30uL
5x 蛋白 Loading buffer	SCCHR-13	150uL
阳性对照体系：(-20℃保存)		
阳性对照探针 TERC	SCCHR-14	10 uL
阴性对照探针 LacZ	SCCHR-15	15 uL
阳性对照抗体 TCAB1 (abcam, ab99376)	SCCHR-16	10 uL, 足够检测 4-5 个 Western blots
RNA q-pcr 阳性检测引物 TERC	SCCHR-17	50 uL (10uM)
RNA q-pcr 阴性检测引物 GAPDH	SCCHR-18	50 uL (10uM)
端粒 DNA Southern 检测探针	SCCHR-19	10 uL
Alu DNA Southern 检测探针	SCCHR-20	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。

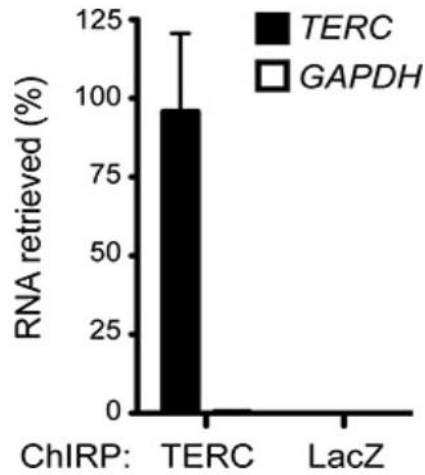


图1 q-pcr 检测 TERC 探针富集目标 RNA 效率

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: CCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAA

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。

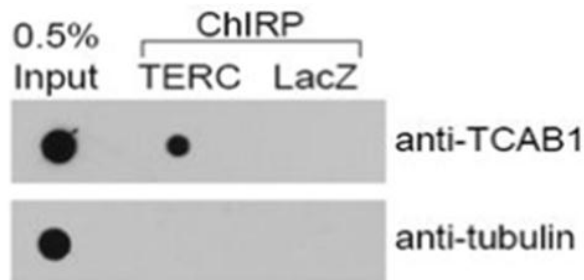


图3 western blot 检测 TERC 富集的 TCAB1

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。

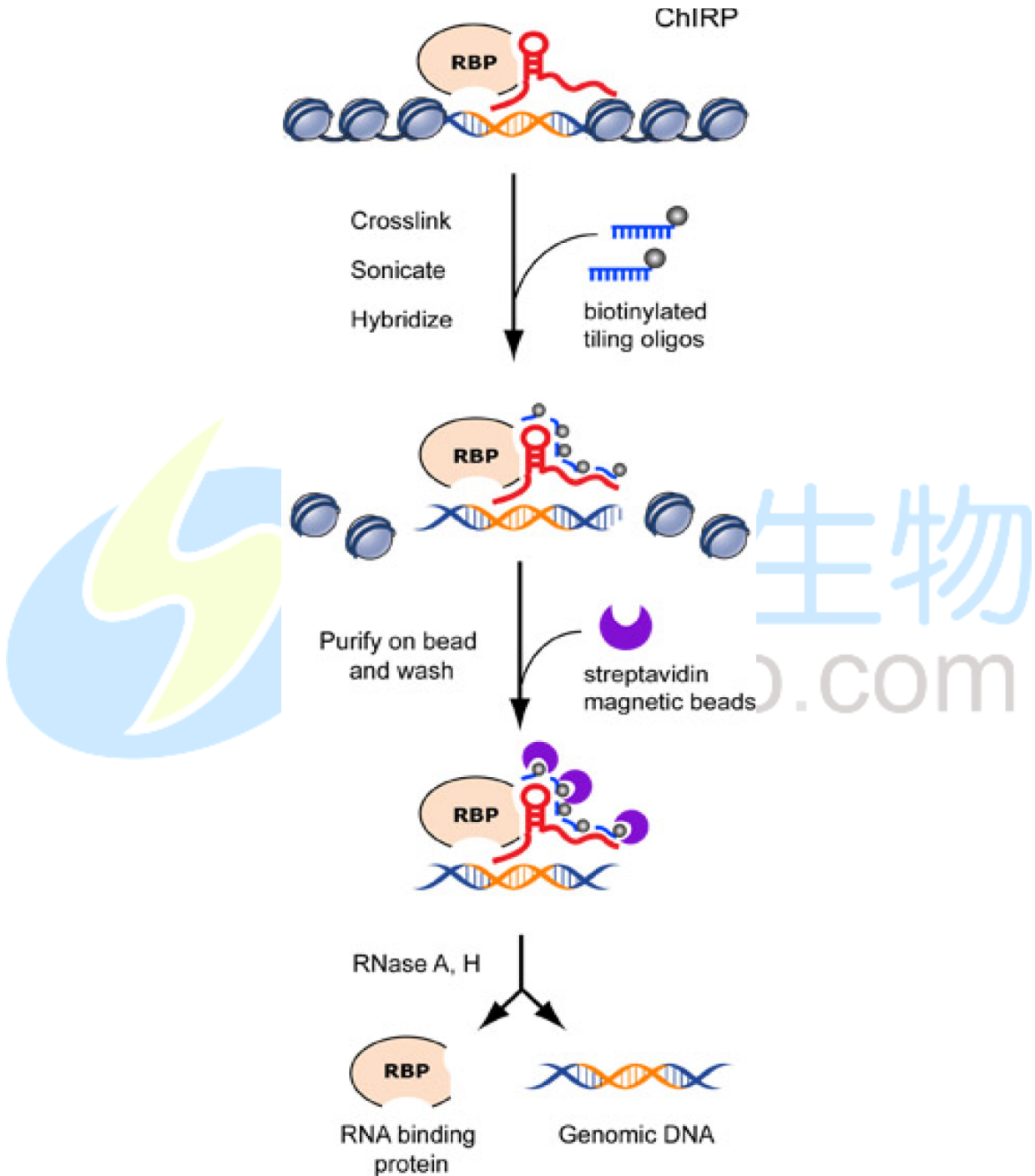


图 4 ChIRP 实验流程图

注意事项:

- 1 蛋白酶抑制剂要在使用前再加入细胞裂解液中
- 2 操作过程中不要剧烈吹打磁珠，控制孵育时间和清洗条件
- 3 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
- 4 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
- 5 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
RNA 逆转录试剂
Q-pcr 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

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 2×10^6 个。
- 2、于细胞培养基中加入多聚甲醛（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。
- 3、加入浓度为甘氨酸（10x），至其终浓度为 1x，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。

B 细胞裂解与染色体超声断裂

在交联的细胞中加入 1mL 含有蛋白酶抑制剂的 Lysis Buffer，涡旋震荡 15s，然后进行超声处理使染色体断裂为 300-1000bp 左右的片段。

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。

D 染色质免疫沉淀

- 1、取上述步骤所得上清液 50 μ l 至 1.5ml 离心管，储存于 -20 $^{\circ}$ C，此为 Input。

2、取上述步骤所得上清液500 μ l至1.5ml离心管中，加入2倍体积的Hybridization buffer，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 $^{\circ}$ C旋转孵育4h。

Positive control IP: 端粒酶RNA---TERC探针。

Negative control IP: LacZ探针。

Target-specific IP: 目的基因探针。

3、在探针与裂解液孵育将近4h后进行磁珠处理，每个IP组取100U1链霉亲和素磁珠，用Lysis Buffer洗2-3次，备用。

4、探针与裂解液孵育4h后，向管中加入处理好的磁珠，37 $^{\circ}$ C旋转孵育30min。

5、3000g离心30s，弃掉上清。

6、加入1ml Wash Buffer，3000g离心30s，弃掉上清液。

7、重复清洗5-6次，每次在37 $^{\circ}$ C旋转洗5min。

8、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组取等量提取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：向磁珠中加入50ul PK buffer和0.2U/uL Proteinase K，于65 $^{\circ}$ C孵育45min，然后95 $^{\circ}$ C孵育5min使DNA探针与目的RNA分开，迅速置于冰上，加入TRIZOL提取RNA。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 $^{\circ}$ C孵育30min，后加入0.2U/uL Proteinase K，于65 $^{\circ}$ C孵育45min，然后用DNA纯化试剂盒提取DNA，DNA产物可用于q-pcr检测或测序

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 $^{\circ}$ C孵育30min，后加入10U1 5x蛋白Loading buffer，100 $^{\circ}$ C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。