

## Chromatin Isolation by RNA Purification(ChIRP) Kit

### ChIRP 试剂盒说明书

#### KT105-01 系列：不带阳性对照体系

Cat.No. KT105-0101 (12 rxns)

Cat.No. KT105-0102 (24 rxns)

Cat.No. KT105-0103 (48 rxns)

#### KT105-02 系列：包含阳性对照体系

Cat.No. KT105-0201 (12 rxns)

Cat.No. KT105-0202 (24 rxns)

Cat.No. KT105-0203 (48 rxns)

按试剂标签提示分开储存

For research use only, not intended for diagnostic testing.

## 产品简介:

Chromatin Isolation by RNA Purification (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。本产品可用于在捕获大多数动物组织和细胞中 lincRNA 或者 circRNA 结合的 DNA 和蛋白。

## 试剂盒包装组分:

表 1 KT105-01 试剂盒包装组分信息

室温保存试剂				
编号	试剂	数量(12 rxns)	数量(24 rxns)	数量(48 rxns)
SCCHR-1	Cell lysis buffer	25mL	50mL	100mL
SCCHR-2	Hybridization buffer	25mL	50mL	100mL
SCCHR-3	Wash buffer	65mL	130mL	260mL
SCCHR-4	PK buffer	1.5mL	3mL	6mL
SCCHR-5	elution buffer	2.5mL	5mL	10mL
4℃保存试剂				
SCCHR-6	ProteinaseK	205uL	410uL	820uL
SCCHR-7	SA-链霉亲和素磁珠	1.5mL	3mL	6mL
-20℃保存试剂				
SCCHR-8	蛋白酶抑制剂	150uL	300uL	600uL
SCCHR-9	PMSF	150uL	300uL	600uL
SCCHR-10	RNase inhibitor	120uL	240uL	480uL

表 1 KT105-02 阳性试剂盒包装组分信息

室温保存试剂				
编号	试剂	数量(12 rxns)	数量(24 rxns)	数量(48 rxns)
SCCHR-1	Cell lysis buffer	25mL	50mL	100mL
SCCHR-2	Hybridization buffer	25ml	50ml	100ml
SCCHR-3	Wash buffer	65ml	130ml	260ml
SCCHR-4	PK buffer	1.5ml	3ml	6ml
SCCHR-5	elution buffer	2.5mL	5mL	10mL
4℃保存试剂				
SCCHR-6	ProteinaseK	205uL	410uL	820uL
SCCHR-7	SA-链霉亲和素磁珠	1.5ml	3ml	6ml
-20℃保存试剂				
SCCHR-8	蛋白酶抑制剂	150uL	300uL	600uL

SCCHR-9	PMSF	150uL	300uL	600uL
SCCHR-10	RNase inhibitor	120uL	240uL	480uL
<b>阳性对照体系：（-20℃保存）</b>				
SCCHR-11	阳性对照探针 TERC (100pmol/ul)	15 uL	30 uL	60 uL
SCCHR-12	阴性对照探针 LacZ (100pmol/ul)	15 uL	30 uL	60 uL
SCCHR-13	RNA q-pcr 阳性检测引物 TERC (F/R) mix	25 uL (10uM)	50 uL (10uM)	100 uL (10uM)
SCCHR-14	RNA q-pcr 阴性检测引物 GAPDH (F/R) mix	25 uL (10uM)	50 uL (10uM)	100 uL (10uM)
SCCHR-15	端粒 DNA Southern 检测探针	10 uL	20 uL	40 uL
SCCHR-16	Southern 阴性探针 Alu	10 uL	20 uL	40 uL

**注：**对照组与实验组消耗试剂量相同，一次 ChIRP 实验含 Input 组、目的探针组、阴性探针组，要消耗 2 rxns 试剂量。

#### 阴性对照探针（试剂盒包含）

ChIRP 实验阴性对照探针一般是 LacZ 探针，赛诚参考序列如下：

ChIRP_LacZ_P1	CTGAATATCGACGGTTTCCA
ChIRP_LacZ_P2	GCTGTATCGCTGGATCAAAT
ChIRP_LacZ_P3	GTCGTTTTACAACGTCGTGA

#### 阳性对照探针（阳性试剂盒包含）

阳性对照体系为端粒 RNA、端粒 DNA 和 TCAB1 蛋白的互作，阳性探针为 TERC-RNA 探针，序列如下：

ChIRP_TERC-P1	GACAAAAAATGGCCACCACC
ChIRP_TERC-P2	CAGCAGCTGACATTTTTTGT
ChIRP_TERC-P3	TGACAGAGCCCAACTCTTCG
ChIRP_TERC-P4	AAGCGAACTGCATGTGTGAG
ChIRP_TERC-P5	CAGGTTTGGGGTTTCAACAG

#### q-pcr 检测引物：

TERC_Q-PCR_F	agagttgggctctgtcagc
TERC_Q-PCR_R	aggaaagcgaactgcatgt
GAPDH (RNA)-human_F	tccatggcaccgtcaag
GAPDH (RNA)-human_R	cagccttctccatggtgg

端粒 DNA Southern 检测探针序列: CCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAA

Southern 阴性探针 Alu 序列: GTGATCCGCCCGCCTCGGCCTCCCAAAGTG

## 实验过程摘要:

染色质在体内与 RNA、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。

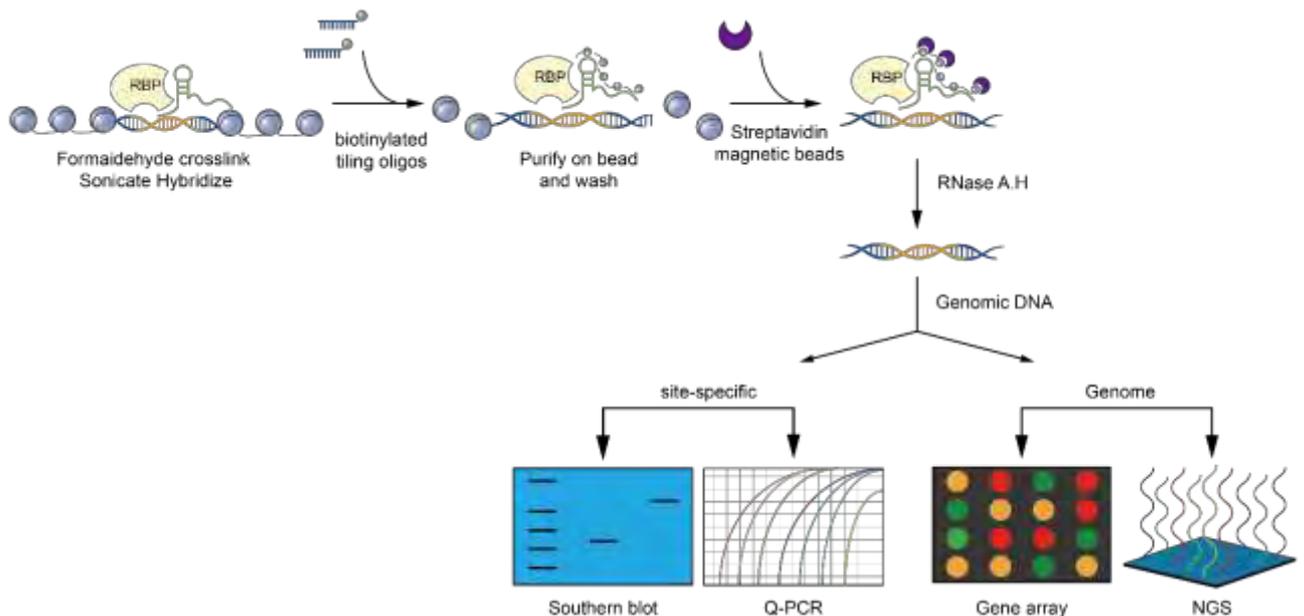


图 1 ChIRP 试剂盒实验过程示意图

## 实验前准备

### 细胞准备

**A 动物组织处理：** 细胞交联

细胞量：约  $1 \times 10^8$  个

动物组织经过组织匀浆或液氮研磨后，去除大颗粒组织后用 PBS 重悬细胞，然后进行甲醛交联，交联步骤参考如下：

1. 交联试剂配制：用 1xPBS 将 37% 甲醛稀释到 1% 浓度的溶液，混匀，一般现配现用；

2. PBS 重悬的细胞经 3000rpm 离心后去除上清液，加入交联试剂重悬细胞，需旋转交联，防止细胞聚团，交联试剂参考用量为  $1 \times 10^7$  细胞使用 1mL；

注：组织交联时间一般为 30min，可根据组织类型调节，交联时间过长，染色质不容易打断，交联时间过短，染色质容易打得过碎。

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）到交联体系中摇匀，旋转孵育 5min，终止交联反应；

4. 3000rpm 离心后去除上清液，加入 1ml 预冷 PBS 重悬细胞，然后离心去上清。

5. 重复上述清洗步骤 2 次，一共洗 3 次。最后去除上清液，留下细胞沉淀备用。

注：细胞沉淀尽量将上清液彻底吸干再保存。

### B 动悬浮细胞交联：

细胞量：约  $1 \times 10^8$  个

悬浮细胞培养后之后收集到 1.5mL EP 管中进行甲醛交联，交联步骤参考如下：

1. 交联试剂配制：用 1xPBS 将 37% 甲醛稀释到 1% 浓度的溶液，混匀，一般现配现用；

2. 悬浮细胞经 3000rpm 离心后去除上清液，加入交联试剂重悬细胞，需旋转交联，防止细胞聚团，交联试剂参考用量为  $1 \times 10^7$  细胞使用 1mL；

注：细胞交联时间一般为 10min，可根据细胞类型调节，交联时间过长，染色质不容易打断，交联时间过短，染色质容易打的过碎。

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）到交联体系中摇匀，旋转孵育 5min，终止交联反应；

4. 3000rpm 离心后去除上清液，加入 1ml 预冷 PBS 重悬细胞，然后离心去上清。

5. 重复上述清洗步骤 2 次，一共洗 3 次。最后去除上清液，留下细胞沉淀-80℃ 保存备用或直接进行实验。

注：细胞沉淀尽量将上清液彻底吸干再保存。

### C 贴壁细胞交联：

细胞量：约  $1 \times 10^8$  个

贴壁细胞培养好之后有两种方法进行交联，一种是用细胞刮刮下收集到 EP 管中按悬浮细胞进行交联，另一种是直接培养皿中交联后再收集到 EP 管：

1. 交联试剂配制：用 1xPBS 将 37% 甲醛稀释到 1% 浓度的溶液，混匀，一般现配现用；

注：一个 10cm 的培养皿大约需要 3-5mL 交联试剂。

2. 培养皿吸除培养基，然后加入适量的交联试剂，以覆盖住全部细胞略有多余为宜，室温静止交联 10min；

注：细胞交联时间一般为 10min，可根据细胞类型调节，交联时间过长，染色质不容易打断，交联时间过短，染色质容易打的过碎。

3. 交联完成后，每 1mL 交联样本加入 100uL 10x 甘氨酸终止液（10x 甘氨酸终止液为 1.25M 甘氨酸）混匀，室温静止终止交联 5min，去掉液体；

4. 然后细胞用胰酶消化或用细胞刮刮下来，收集到 1.5ml EP 管，3000rpm 离心后去除上清液；

5. 加入 1-2ml PBS 轻轻重悬细胞，3000rpm 离心 5min，去掉液体。重复该步骤 2-3 次，最后一次要把液体去除干净，样品放-80℃保存备用或直接进行实验。

注：细胞沉淀尽量将上清液彻底吸干再保存。

### 探针准备：

#### A 线性 RNA 探针准备

1. 根据靶标 RNA 序列，每 100nt 中选择一条段为 20nt 序列，设计其反向互补的 DNA 序列作为 ChIRP 探针；
2. 将设计的 DNA 序列分别合成多条带 biotin 标记的探针，5' 末端或 3' 末端标记均可；
3. 多条探针计算好浓度混合为包含各 100pmol/uL 或 50pmol/uL 的混合探针溶液，用 NF 水溶解即可，使用时每 1mL 的细胞裂解液用 100pmol 探针。

#### B circRNA 探针准备

1. 根据靶标 RNA 序列，在环状节点位置选择一条段为 20nt 序列（节点前后各取 7-13nt），设计其反向互补的 DNA 序列作为 ChIRP 探针；
2. 将设计的 DNA 序列分别合成多条带 biotin 标记的探针，5' 末端或 3' 末端标记均可；
3. 将探针溶解 100pmol/uL 或 50pmol/uL 的混合探针溶液，用 NF 水溶解即可，使用时每 1mL 的细胞裂解液用 100pmol 探针

(赛诚提供探针制备服务，如有需要欢迎咨询)

### 需要的额外材料：

#### 试剂：

37%甲醛

甘氨酸

RNase H

RNase A

Trizol 溶液

氯仿（三氯甲烷）

DNA 纯化试剂盒

RNA 逆转录试剂

Q-pcr 试剂

DNA 建库试剂（高通量测序需要）

#### 仪器设备：

电泳仪等

磁力架（赛诚有售，如有需要欢迎咨询）

超声破碎仪

旋转孵育器

Q-pcr 仪

## ChIRP 实验步骤

注：实验全程环境为 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

### A 细胞裂解与染色体断裂

1. 向 Cell lysis buffer (SCCHR-1) 中加入蛋白酶抑制剂和 RNA 酶抑制剂，每 mL 加入 12uL PMSF (SCCHR-9) 和 10uL 蛋白酶抑制剂 (SCCHR-8) 和 5uL RNase inhibitor (SCCHR-10)；
2. 在交联的细胞沉淀中加入 1mL 含有蛋白酶抑制剂和 RNA 酶抑制剂的 Lysis Buffer，吹打重悬并涡旋震荡 15s；
3. 用超声破碎仪处理使染色体断裂为 100-500bp 左右的片段。1, 2000rpm 4℃ 离心 15min 后取上清至新的 EP 管中。

注：一次 1mL 的染色体断裂的细胞裂解液可以分为 input, target 组, lacZ 组, 即两个反应的量。

（**超声条件：**根据不同超声仪型号设置，一般 4℃ 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：如果没有适合的超声仪，也可以参考 ChIP 实验使用 MNase 酶切进行染色体断裂。MNase 推荐 NEB 货号 M0247S，处理详细步骤参考赛诚 ChIP 试剂盒说明书。

#### 4. 检测染色质断裂情况：

取 10uL 样本，加入 90uL Elution buffer (SCCHR-5)。65℃ 孵育 2h，加入 2uL 蛋白酶 K (SCCHR-6)，孵育 1h。酚氯仿或 DNA 纯化试剂盒提取 DNA，2% 凝胶电泳检测打断结果。打断的 DNA 片段长度在 100-1000 的范围，最好在 100-500 之间。

注：不同细胞类型染色体断裂的程度会有所差别，可能需要根据断裂情况适当减少或增加酶解时间和酶的用量。

## B 染色质免疫沉淀

1. 取上述步骤所得上清液 45μL 至 1.5mL 离心管，储存于 -20℃，此为 Input。
2. 取上述步骤所得上清液 450μL 至 1.5mL 或 2mL 的离心管中，加入 2 倍体积（即 0.9mL）的 Hybridization buffer (SCCHR-2)，并加入 5uL RNase inhibitor (SCCHR-10)，并按每个反应加入 100pmol（约 500~600ng）探针的量加入标记的 DNA 探针，于 37℃ 旋转孵育 4h。

Negative control IP: LacZ 探针。

Target-specific IP: 阳性对照探针（或者目的探针）。

3. 在探针与裂解液孵育将近 4h 时进行磁珠预处理，即每个 IP 组取 100uL 链霉亲和素磁珠 (SCCHR-7) 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 500uL Lysis Buffer (SCCHR-1) 洗磁珠 2 次，吸除上清备用。

注：磁珠不要冰冻，不要干裂，操作过程中不要剧烈吹打磁珠

4. 探针与裂解液孵育 4h 后，转移至处理好的磁珠管中，37℃ 旋转孵育 30min。
5. 轻微离心后置于磁力架上待溶液澄清，弃掉上清液。

6、加入 1mL Wash Buffer (SCCHR-3) 在 37°C 旋转洗 5min, 轻微离心后置于磁力架上待溶液澄清弃掉上清液。

7、重复清洗 5 次。

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 (1/10-1/5) 提取 RNA。

### C RNA、DNA 的洗脱

#### RNA洗脱 (1/10-1/5) :

1. 向磁珠中加入 50uL PK buffer (SCCHR-4) 和 5uL Proteinase K (SCCHR-6), 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 Trizol 溶液提取 RNA。

2. 再加入 100  $\mu$ L 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;

注: 在抽提 RNA 过程中, 要小心吸取上清, 避免吸到下层有机相

3. 加入 2.5 倍体积无水乙醇混匀 (可选择加入 1-2uL 糖原帮助沉淀, 糖原可使用碧云天的) 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。

注: 乙醇沉淀 RNA 后要小心移除上清, 防止 RNA 丢失

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

#### RNA q-pcr 检测注意事项:

1. 为了保证单一变量, input 组、阳性探针组、阴性组获得的 RNA 产物最终用相同体积的水溶解, 并且在逆转录过程中用相同体积 RNA 进行逆转录, 不要测浓度之后把产物浓度调平。

2. input 组一般是取 10% 的量提取的 RNA, q-pcr 的到的 Ct 值是 1/10 底物的数据, 计算时 Ct 要减去 3.3。

#### 3. Q-pcr 结果计算示例:

$$\Delta Ct [\text{normalized IP}] = (Ct [\text{IP}] - (Ct [\text{Input}] - \text{Log}_2 (\text{Input Dilution Factor})))$$

$$\% \text{ Input} = 2^{(-\Delta Ct [\text{normalized IP}])} * 100\%$$

我们的 input 通常去总量的 1/10, 即稀释了 10 倍,  $\text{Log}_2 (\text{Input Dilution Factor}) \approx 3.3$

计算示例：

	input	UIC
U1	14.05	17.55

$$\Delta Ct = 17.55 - (14.05 - 3.3) = 6.8 \quad \%input = 2^{-(6.8)} * 100\% = 0.9\%$$

阴性对照组与目的组计算方法一样，最后比较目的组和阴性对照组的相对捕获量。

### DNA 洗脱（剩下的磁珠和 input）：

1. 向磁珠中加入 100uL DNA elution buffer（SCCHR-5），100ug/mL RNase A 和 0.1U/uL RNase H，于 37℃ 孵育 30min；

注：这里的 RNase A 和 RNase H 是终浓度。

2. 加入 10uL Proteinase K（SCCHR-6），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。

注：在抽提 DNA 过程中，要小心吸取上清，避免吸到下层有机相

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。所得 DNA 产物进行 q-pcr 检测或者进行高通量测序。

注：乙醇沉淀 DNA 后要小心移除上清，防止 DNA 丢失

### **DNA q-pcr 检测注意事项：**

1. 为了保证单一变量，input 组、阳性探针组、阴性探针组获得的 DNA 产物最终用相同体积的水溶解，并且在 q-pcr 检测时用相同体积进行，不要测浓度之后把产物浓度调平。

2. input 组一般是取 10% 的量提取的 RNA，q-pcr 的得到的 Ct 值是 1/10 底物的数据，计算时 Ct 要减去 3.3。

3. Q-pcr 结果计算与 RNA 计算方法相同。

## 高通量测序注意事项：

1. 高通量测序一般测input组和target组的DNA产物，input归一化处理作为target组捕获DNA的基准线；
2. ChIRP-seq文库构建可以使用进口的KAPA或者国产诺唯赞的DNA建库试剂盒，相关试剂盒信息如下：  
KAPA: KAPA HyperPrep Kits (roche.com) 货号KK8500  
诺唯赞: VAHTS Universal DNA Library Prep Kit for Illumina V3 货号ND607
3. ChIP-seq的DNA要求：不同RNA结合的DNA量不同，建库的DNA起始量参考建库试剂盒说明，一般DNA总量1-100ng左右，如果捕获的DNA过少可能是结合的少或实验失败，过少的DNA量会导致建库失败以及测序的有效数据量少。
4. 赛诚生物提供DNA建库、高通量测序及生信分析全套服务，如有需要，欢迎咨询。

## 蛋白的洗脱（剩余的磁珠和 input）：

如果只做 RNA 结合蛋白，建议购买 KT106 RAP 试剂盒进行实验。

1. 向磁珠中加入 40uL elution buffer, 100ug/mL RNase A 和 0.1U/uL RNase H, 于 37°C 孵育 30min;

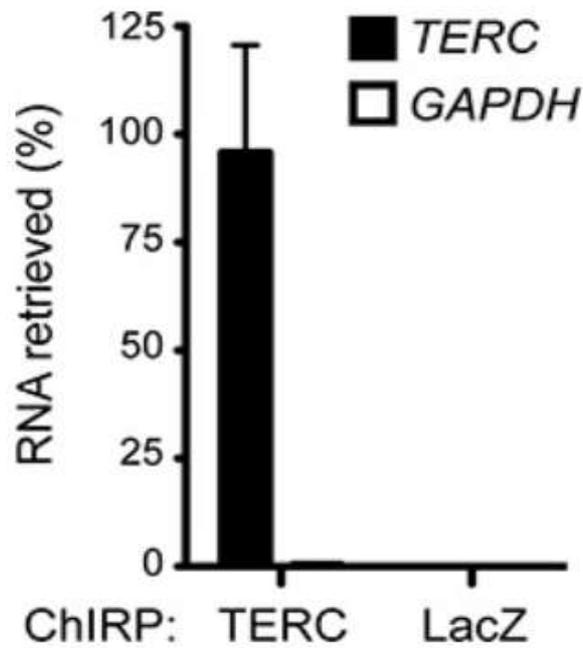
注：这里的 RNase A 和 RNase H 是终浓度。

2. 后加入 10uL 5x 蛋白 Loading buffer, 100°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。

## 结果示例：

### 阳性对照体系：

图显示来自 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。



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 杂交检测端粒 DNA 与 TERC RNA 的结合。

Southern 探针序列：

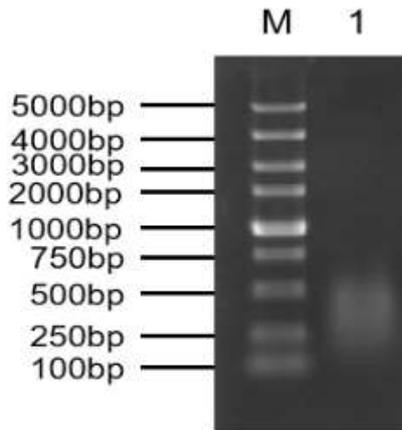


Southern blot 检测端粒 DNA 与 TERC RNA 的结合

### ChIRP-DNA-qPCR 案例：

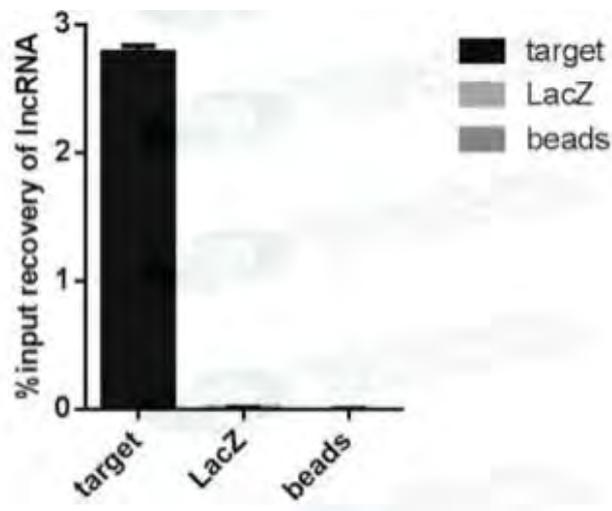
通过 ChIRP-DNA-qPCR 实验验证 LncRNA-A 与 gene-B 启动子的结合

染色体断裂检测结果：



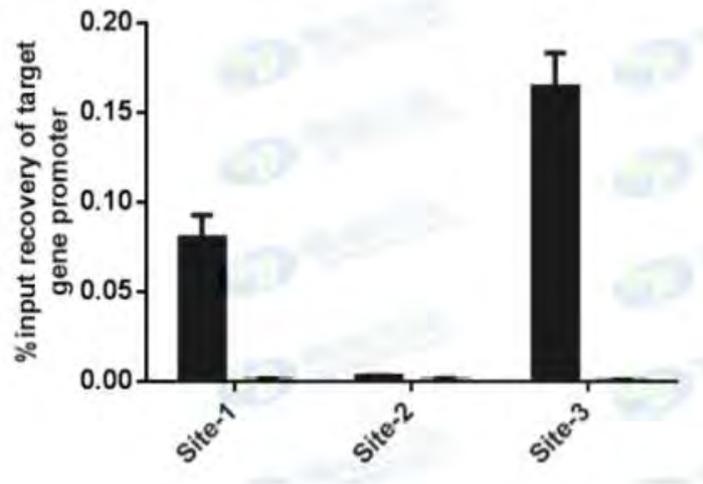
ChIRP 实验要求染色体断裂的 DNA 片段在 100-1000bp 之间，如果是高通量测序 DNA 片段大小最好在 100-500 之间。这是 ChIRP-DNA 的必要质控点。

#### Q-pcr 检测探针对靶标 RNA 的有效捕获：



q-pcrx 结果显示 lncRNA-A 反向互补探针能有效捕获靶标 lncRNA-A。这是 ChIRP-DNA 的必要质控点。

#### 检测 RNA 结合的 DNA 结果：



LncRNA-A 与 gene-B 启动子的结合，通过信息学预测或者其他途径得到 3 个可能的结合位点，然后通过 ChIRP-qpcr 检测，结果表明位点 1 和位点 3 都有 lncRNA 的结合，位点 3 结合最多，而位点 2 不结合。