

## CHIRP 试剂盒说明书

**产品货号：**KT105-01

**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 12 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	25mL
Hybridization buffer	SCCHR-2	25mL
Wash buffer	SCCHR-3	65 mL
链霉亲和素磁珠	SCCHR-4	1.5 mL
PK buffer	SCCHR-5	1.5 mL
DNA elution buffer	SCCHR-6	1.5 mL
-20℃保存试剂		
蛋白酶抑制剂	SCCHR-7	100uL
PMSF	SCCHR-8	100uL
RNase inhibitor	SCCHR-9	100uL
Proteinase K	SCCHR-10	200uL
5x SDS Loading buffer	SCCHR-11	150uL

### 需要的额外材料：

生物素标记的目标 RNA 反向序列 DNA 探针

戊二醛或甲醛

甘氨酸

RNase H

RNase A

DNA 纯化试剂盒

RNA 逆转录试剂

Q-pcr 试剂

银染试剂

Southern 杂交试剂

旋转仪

Western blotting 试剂

Nitrocellulose 或 PVDF 膜

化学发光底物

电泳仪等

磁力架

### 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。

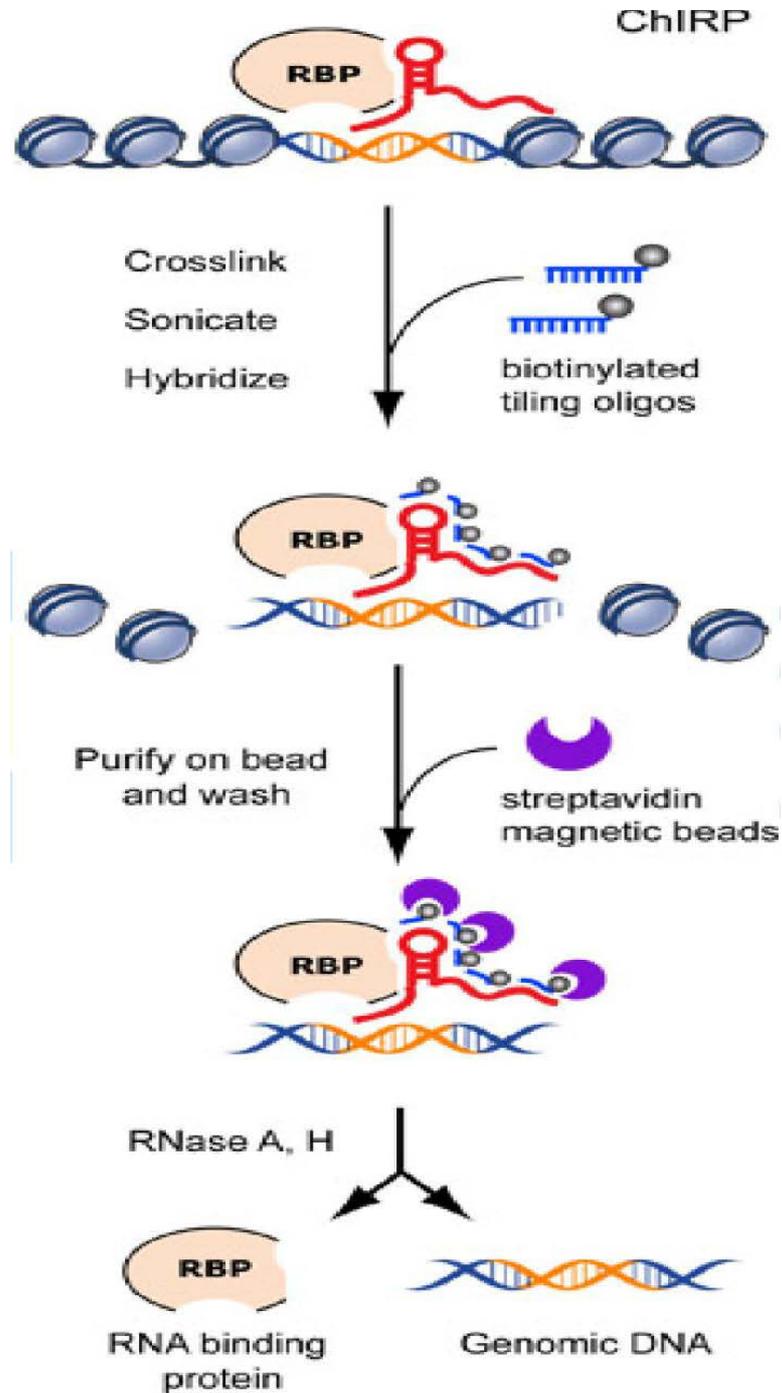


图 4 ChIRP 实验流程图

## 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，3000rpm 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 和蛋白的可以不进行交联。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 和 10uL 蛋白酶抑制剂，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℃ 离心 15min 后取上清至新的 EP 管中。

（**超声条件：**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、取上述步骤所得上清液 50μl 至 1.5ml 离心管，储存于 -20℃，此为 Input。
- 2、取上述步骤所得上清液 500μl 至 1.5ml 或 2mL 的离心管中，加入 2 倍体积（即 1mL）的 Hybridization buffer，并加入 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℃ 旋转孵 4h。  
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 500uL 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℃ 旋转孵 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 在 37℃ 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℃ 孵育 45min，然后 95℃ 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℃，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℃ 沉淀过夜。

（4）第二天取出在 4℃，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 10ul 5x 蛋白 Loading buffer，100℃ 煮 10min 后取上清于新的 EP 管中即为蛋白产物。蛋白产物可用于银染，质谱或 WB 检测。

### **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敲打磁珠，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 方法跑胶转膜进行检测。