

ChIRP试剂盒

Chromatin Isolation by RNA Purification (ChIRP) Kit

注:本本产品干冰运输;试剂按说明书分别保存于4℃及-20℃,保质期12个月。

序号	试剂	货号及规格			储存
		IRR041 (6T)	IRR041M (12T)	IRR041L (24T)	
01	1.375 M Glycine	12 mL	24 mL	48 mL	4℃
02	Swelling Buffer	12mL	24mL	24mL	4℃
03	Nuclear lysis buffer	3.9mL	7.8mL	15.6mL	4℃
04	Agarose beads	0.3mL	0.6mL	1.2mL	4℃
05	Streptavidin Beads	0.3mL	0.6mL	1.2mL	4℃
06	10 mM Tris-HClpH	4.5mL	9mL	18mL	4℃
07	Hybridization Buffer	7.2mL	14.4mL	28.8mL	4℃
08	Wash Buffer	22.5mL	45mL	90mL	4℃
09	RNA Elution buffer	0.9mL	1.8mL	3.6mL	4℃
10	5xProteinase K buffer	0.3mL	0.6mL	1.2mL	4℃
11	Glycogen	12μL	24μL	48μL	4℃
12	3M NaAc	0.33mL	0.66mL	1.32mL	4℃
13	RNase-free water	0.48mL	0.96mL	1.92mL	4℃

14	DNA Elution Buffer	3mL	6mL	12mL	4°C
15	Protein Elution Buffer	0.36 mL	0.72 mL	1.44mL	4°C
16	Protease inhibitor	0.22mL	0.44mL	0.88mL	-20°C
17	DTT	0.23mL	0.45mL	0.9mL	-20°C
18	RNase Inhibitor	30μL	60μL	0.12mL	-20°C
19	Proteinase K	38μL	75μL	0.15mL	-20°C
20	RNase A	38μL	75μL	0.15mL	-20°C

产品简介/Product Description

ChIRP(Chromatin Isolation by RNA Purification) 是一种检测与 RNA 绑定的 DNA 和蛋白的高通量检测方法；

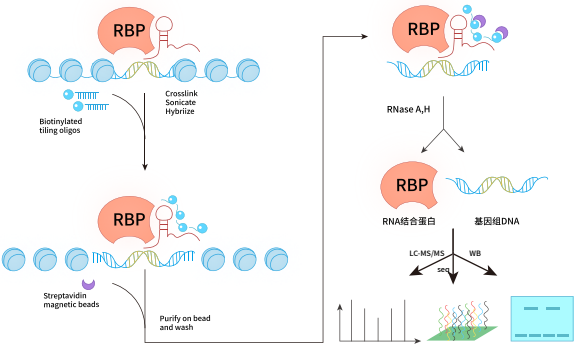
ChIRP 方法是通过设计生物素标记 RNA 互补探针，其与链霉素亲和素结合，将目标 RNA 特异性结合的同时，特异性捕获 RNA 结合调控的 DNA 染色体片段及参与转录调控的 RNA 结合蛋白质（RBPs）；

最后，DNA 染色体片段经过构建文库及高通量测序，可以基因组水平获得转录调控 RNA（增强子 RNA, eRNA）转录调控的下游靶基因，结合 qPCR 可以研究结合调控强度；

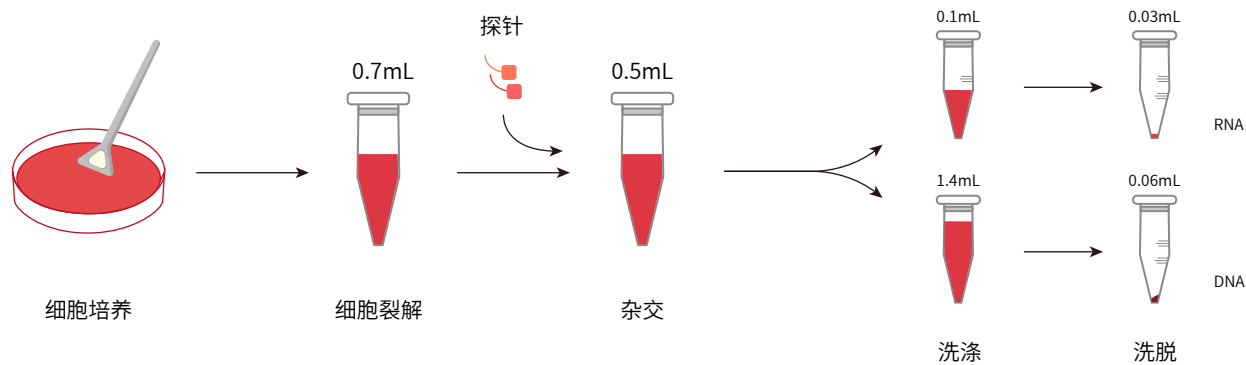
RNA 结合蛋白经过酶消化及高效液相 - 质谱分析，可以鉴定参与转录调控的蛋白质，结合 western blot 可以进一步研究结合作用强度。

技术路线/Technology mapping

1. 原理流程图



2. 实验操作流程图



使用流程/Procedure

1. 样本处理和交联

细胞样本

- ①胰酶消化获得 2×10^7 细胞，10 mL 1×PBS 洗涤两次，每次 1000 rpm，离心 5 分钟收集细胞；
- ②加入 20 mL 1×PBS（含 0.54 mL 37% 甲醛，甲醛终浓度 1%）重悬细胞，垂直混匀器室温交联 10 min；
- ③加入 2 mL 1.375 M Glycine，垂直混匀器室温中和 5 min；
- ④4 °C，1500 rpm，离心 5 分钟收集细胞，弃上层 PBS 溶液；
- ⑤加入 10 mL 预冷的 1×PBS，洗涤两次细胞，每次 4 °C，1000 rpm 离心 5 分钟，弃上清，收集细胞。

组织样本

- ①新鲜组织 0.2 g：使用剪刀充分剪碎至 1 mm³ 体积，加入 20 mL 1×PBS（含 0.54 mL 37% 甲醛，甲醛终浓度 1%），垂直混匀器室温交联 20 min；深低温保存的冻存组织 0.2 g：直接用液氮研磨至均匀粗粉，加入 20 mL 1×PBS（含 0.54 mL 37% 甲醛，甲醛终浓度 1%），垂直混匀器室温交联 20 min；
- ②加入 2 mL 1.375 M Glycine，垂直混匀器室温中和 5 min，结束后置于冰上；
- ③4 °C，1500 rpm，离心 5 分钟收集细胞，弃上层 PBS 溶液；
- ④加入 10 mL 预冷的 1×PBS，洗涤两次组织，每次 4 °C，1000 rpm 离心 5 分钟收集组织；
- ⑤匀浆器冰上充分匀浆组织，用 100 μm 过滤收集细胞悬液，可加少量 1×PBS 冲洗；
- ⑥1500 rpm、4 °C 离心 5 分钟，弃上清，收集细胞；
- ⑦用 PBS 重悬细胞，1100 g、4 °C 离心 5 分钟，弃上清，收集细胞。细胞培养：

注意：

1. 每次实验至少需要 2×10^7 细胞量；
2. 甲醛必须新鲜；
3. 建议 1×10^7 细胞使用 10 mL PBS（含 1% 甲醛）交联细胞；
4. 最后一次充分去除干净残余 PBS；
5. 交联后样品可经液氮速冻，-80 °C 保存。

2. 细胞裂解与超声

- ①细胞置于冰上，加入 1 mL Swelling Buffer、10 μL Protease inhibitor、10 μL DTT 冰上静置 5 分钟后，重悬后冰上匀浆器匀浆 10 次，4 °C，2500 g 离心 5 min，弃上清，收集细胞沉淀；
- ②重复操作步骤①一次；
- ③加入 0.7 mL Nuclear lysis buffer、7 μL Protease inhibitor、7 μL DTT、3.5 μL RNase Inhibitor 细胞充分重悬沉淀，冰上静置 10 分钟。
- ④冰浴条件下，3 s ON、5 s OFF、230W 功率超声 10~20 分钟至样品澄清；
- ⑤转移 10 μL 超声样品，1% 琼脂糖凝胶电泳检测超声片段长度，片段长度要求 100-500 bp 范围。在交联的细胞中加入 6 mL 1×Cell lysis buffer，加入 60 μL 100×DTT 和 60 μL 100×Protease inhibitor，并且在冰上裂解 10 min，期间涡旋混匀 2~3 次；
- ⑥将细胞裂解液在 4 °C、13 000 g 离心 15 min，弃沉淀；
- ⑦上清中加入 6 μL RNase T1（终浓度 1 U/μL），22 °C 水浴 15 min 后，立即冰浴 5 min；⑧上清取 200 μL 作为 Input 组，置于 -80 °C 保存，取约 6 mL 作为 IP 组；

3. IP 与磁珠孵育

- ①超声后的样品加入 50 μL Agarose beads，垂直混匀器上 4 °C 孵育结合 30~60 min；
- ②4 °C，4000 g 离心 1 min，转移上清至新离心管中；
- ③转移 100 μL 超声样品作为 DNA Input（标示 Input DNA），液氮速冻后，-80 °C 暂时保存，或直接开展 DNA 提取；

- ④转移 100 μL 超声样品作为 RNA Input (标示 Input RNA), 液氮速冻后, -80°C 暂时保存, 或直接开展 RNA 提取;
- ⑤转移 0.5 mL 超声样品作为 ChIRP 样品 (标示 ChIRP)。
- ⑥探针第一条, 加入 100 倍 nmol 数 μL DEPC 水, 充分涡旋混匀后微离心后转移到第二管, 以此类推溶解每组探针; 若只有一条探针, 则直接加入 100 倍 nmol 数 μL DEPC 水, 充分涡旋混匀后微离心;
- ⑦取 4 μL ncRNA 探针 (组) 溶液 (即 40 pmol 探针 / 条 / 0.5 mL 样品, 探针总量为 $n \times 40$ pmol);
- ⑧ 85°C 变性 3 分钟后, 快速转移冰浴。
- ⑨按 $n(\text{探 针 数 目}) \times 100 \mu\text{L} / (400 \text{ pmol} / 40 \text{ pmol})$ Streptavidin Beads 标准, 准备磁珠, 取 50 μL Streptavidin Beads (以每个探针组含有五条探针为例), 磁力架收集磁珠并去上清;
- ⑩加入 0.5 mL 10 mM Tris-HCl pH 7.5 充分重悬后, 颠倒混匀 10 次, 磁力架收集磁珠并去上清; 3 重复步骤⑨ 2 次; 加入 0.5 mL Hybridization Buffer 充分重悬后, 颠倒混匀 10 次, 待用, 用时磁力架收集磁珠并去上清。

注意:

1. RNA 按照序列每间隔 150~200bp 设计一条探针, 制备探针组;
2. 探针 (组) 总浓度 $n \times 10 \text{ pmol} / \mu\text{L}$;
3. 溶解后的探针 -20°C 保存。
4. 100 μL beads / 400 pmol probes;
5. 默认配置 1T: 50 μL beads / 200 pmol probes;
6. 以 $n=5$ 条探针组为例, 需加探针总量为 200 pmol, 对应磁珠 50 μL ;

4. ChIRP

- ①ChIRP 组样品加入 2 倍细胞裂解液体积杂交缓冲液 (1 mL Hybridization Buffer、10 μL Protease inhibitor、10 μL DTT、2 μL RNase Inhibitor);
- ②将 ChIRP 样品在垂直混匀器上 65°C 温育变性 10 min, 分别将探针 (组) 加入到变性样品加中, 37°C 杂交 30 min, 50°C 温育变性 5 min, 37°C 杂交 90~180 min;
- ③将 ChIRP 样品 - 探针 (组) 样品加入到准备好磁珠中, 室温垂直混匀器上温育结合 30 min; ④磁力架收集磁珠并去上清;
- ⑤加入 1 mL 37°C 预热的 wash buffer 颠倒混匀后, 37°C 垂直混匀器上温育洗涤 5 min, 磁力架收集磁珠并去上清;
- ⑥重复步骤⑤ 3 次;
- ⑦加入 1.5 mL 37°C 预热的 wash buffer, 按 100 μL 及 1400 μL 分装, 分别标示 ChIRP RNA、ChIRP DNA, 磁力架收集磁珠并去上清。

5. RNA 提取

- ①ChIRP RNA 磁珠加入 100 μL RNA Elution Buffer 充分混匀后, 95°C 加热 2 min, 磁力架收集磁珠并转移上清至新无 RNase 离心管中;
- ②重复上述步骤①一次;
- ③收集的 ChIRP RNA 组上清液中加入 50 μL 5 $\times$ Proteinase K buffer、1 μL proteinase K, Input RNA 加入 100 μL RNA Elution Buffer、50 μL 5 $\times$ Proteinase K buffer、1 μL proteinase K;
- ④ 55°C 温育消化 1 h, 中间间隔摇动混匀;
- ⑤加入与上清等体积的苯酚 - 氯仿 - 异戊醇混合液 (25:24:1) 到 ChIRP odd RNA、ChIRP even RNA、ChIRP NC 及 Input 样品, 颠倒混匀 15 秒;
- ⑥13000 g, 4°C 离心 10 分钟, 收集上层水相, 转移到新无 RNA 酶离心管中;
- ⑦加入 1 μL Glycogen、25 μL 3M NaAc 及 625 μL 100% ethanol 充分颠倒混匀;
- ⑧ -20°C 静置 1~16 小时沉淀 RNA 样品;
- ⑨ 4°C , 16000 g 离心 30 分钟, 弃上清; 加入 1 mL 预冷的 80% 乙醇, 4°C , 16000 g 离心 10 分钟, 弃上清; 室温静置风干 10 分钟; 加入 30 μL RNase-free water, 冰上静置保存;

⑩RNA 样品经随机引物法逆转录后，以 GADPH 为阴性对照开展 qPCR 定量分析富集效率。

注意：

1. 苯酚为水饱和酚；
2. 提取 RNA 可以用 Trizol 提取法替代；
3. RNA -80℃、cDNA

6. DNA 提取

- ①ChIRP DNA 组磁珠分别加入 300μL DNA Elution Buffer、3 μL RNase A 充分重悬，Input 组加入 200 μL DNA Elution Buffer、3 μL RNase A；
- ②37℃温育消化 30min，中间间隔摇动混匀；
- ③磁力架收集磁珠，转移上清到新离心管中；
- ④每管加入 5μL Proteinase K 充分混匀后，55℃温育消化 1h，中间间隔摇动混匀；
- ⑤加入 300 μL 苯酚 - 氯仿 - 异戊醇混合液 (25:24:1) 充分颠倒混匀后，室温 13000g 离心 10 分钟后，取上清；
- ⑥加入 600 μL 无水乙醇、1 μL Glycogen、30 μL 3M NaAc，充分颠倒混匀后 -20℃沉淀 1~16 小时；
- ⑦4℃，16100 g 离心 30 min，去上清；
- ⑧加入 1mL 预冷 75% 乙醇洗涤一次，4℃，16000 g 离心 30 min，去上清；
- ⑨静置晾干 10 分钟；
- ⑩加入 50μL RNase-free water，37℃温育溶解 10 分钟，样品 -20℃保存备用。
- ⑩RNA 样品经随机引物法逆转录后，以 GADPH 为阴性对照开展 qPCR 定量分析富集效率。

注意：1. 苯酚为水饱和酚；

7. qPCR 测序或定量检测

- ①Input DNA、ChIRP DNA 组 NanoDrop 检测 DNA 浓度；
- ②取 5 μL 样本 2.5% 琼脂糖凝胶 120V 恒压电泳 15 min，检测 DNA 片段大小。
- ③参考 PCR 试剂盒配置反应体系进行 PCR，取 3~5 μL PCR 产物 3% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果。
- ④参考 2×SYBR Green qPCR Mix 试剂盒说明书配置 20 μL PCR 扩增体系进行 qPCR，然后进行数据分析，得到富集效率；
- ⑤取 20 μL DNA 样品高通量测序技术检测 DNA 序列。ChIRP DNA 组磁珠分别加入 300 μL DNA Elution Buffer、3 μL RNase A 充分重悬，Input 组加入 200 μL DNA Elution Buffer、3 μL RNase A；

注意事项/Notes

1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内；
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

