



CLIP-Seq试剂盒

Crosslinking Immunoprecipitation (CLIP) Kit for Seq

注: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。

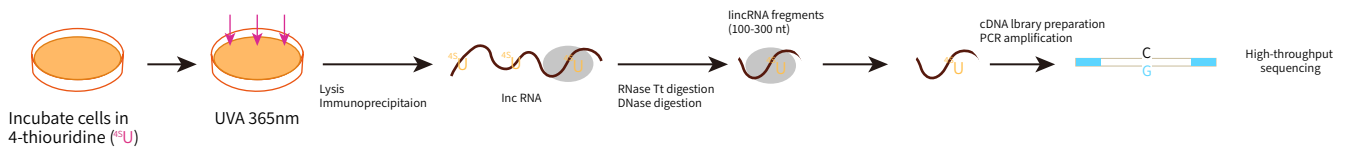
序号	试剂	货号及规格			储存
		IRR040 (6T)	IRR040M (12T)	IRR040L (24T)	
01	PBS (25x)	7.5mL	15mL	30mL	4℃
02	Cell lysis buffer	49.15mL	98.3mL	196mL	4℃
03	Protein A/G Beads	0.24mL	0.48mL	0.96mL	4℃
04	IP Wash buffer	26.5mL	53mL	106mL	4℃
05	2x Proteinase K buffer	0.6mL	1.2mL	2.4mL	4℃
06	100x DTT	0.36mL	0.72mL	1.44mL	-20℃
07	100x Protease inhibitor	0.36mL	0.72m	1.44mL	-20℃
08	IgG	30μL	60μL	0.12mL	-20℃
09	RNase T1	38μL	75μL	0.15mL	-20℃
10	DNase I	0.12mL	0.24mL	0.48mL	-20℃
11	Proteinase K	0.12mL	0.24mL	0.48mL	-20℃
12	ddH ₂ O (RNase DNase free)	0.34mL	0.24mL	1.34mL	-20℃

产品简介/Product Description

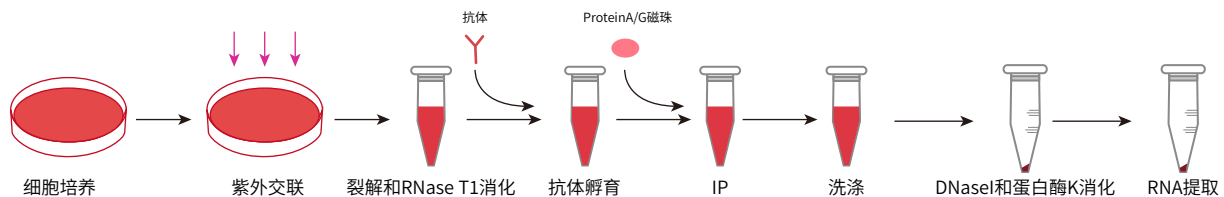
CLIP (crosslinking-immunoprecipitation) 是利用蛋白质和 RNA 在 365 nm 紫外光照射下会发生共价交联的特性, 来研究蛋白质和 RNA 相互作用的重要技术。CLIP-seq (crosslinking-immunoprecipitation and High throughput sequencing) 即紫外交联免疫沉淀结合高通量测序技术, 通过免疫共沉淀 RBP 与 RNA 的结合复合物, 获取纯化及消化 (蛋白酶 K、DNaseI、RNase T1) 后的 RNA, 进行 cDNA 文库构建与测序分析。

技术路线/Technology mapping

1. 原理流程图



2. 实验操作流程



使用流程/Procedure

1. 样本处理和交联

- ①在 3 个 15cm 培养皿中扩大培养细胞, 培养至密度为 80% 的聚合度;
 - ②在交联前 16h 向细胞培养液中加入 4- 硫尿核苷 (4-Thiouridine) 至终浓度 100 μM 。
- 紫外交联 (贴壁细胞)
- ①将培养皿中的细胞用 5mL/ 板预冷的 1 $\times$ PBS (将 PBS(25 $\times$) 稀释至 1 $\times$) 洗 1 次, 吸掉 PBS;
 - ②将细胞放在有冰的托盘上, 置于 365nm 紫外灯 (Spectrolinker XL-1500 (SpectronicsCorporation)) 下进行照射, 照射的剂量设为 0.15 J/cm², 交联时间 10 min;
 - ③在培养板中加 5 mL 1 $\times$ PBS, 然后用细胞刮将细胞刮下, 将细胞转移到 50 mL 无酶离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、500 g 离心 5 min, 去除上清;
 - ④细胞可以用于直接裂解, 也可以用液氮快速冻结并且保存在 -80 $^{\circ}\text{C}$, 冻存的细胞沉淀可以保存至少 12 个月。
- 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 $\times$ 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;
- 紫外交联 (悬浮细胞)
- ①将细胞放在有冰的托盘上, 置于 365nm 紫外灯 (Spectrolinker XL-1500 (SpectronicsCorporation)) 下进行照射, 照射的剂量设为 0.15 J/cm², 交联时间 10 min;
 - ②将悬浮细胞转移到 50 mL 无酶离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、500 g 离心 5 min, 去除上清;
 - ③向细胞沉淀加 5 mL 1 $\times$ PBS, 重悬, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、500 g 离心 5 min, 去除上清;

④细胞可以用于直接裂解，也可以用液氮快速冻结并且保存在 -80 °C，冻存的细胞沉淀可以保存至少 12 个月。
紫外交联 (动物组织)

- ①收集组织 (0.6~0.9 g)，将组织放入装有 5mL 预冷的 1×PBS 的培养皿，轻轻摇动清洗组织后去除 PBS；
- ②将组织转移至液氮预冷的研钵中，对组织进行液氮速冻然后研磨；
- ③将组织转移至培养皿中，置于有冰的托盘上，在 254 nm 紫外灯 (Spectrolinker XL-1500(Spectronics Corporation)) 下进行照射，照射的剂量设为 0.15 J/cm²，交联时间 10 min；
- ④将组织用 5 mL 预冷的 1×PBS 转移到 50 mL 无酶离心管中，4° C、500 g 离心 5 min 收集细胞沉淀并去除上层清液；
- ⑤细胞可以用于直接裂解，也可以用液氮快速冻结并且保存在 -80°C，冻存的细胞沉淀可以保存至少 12 个月。

注意：

1. 样本处理需要及时开展；
2. 实验过程使用无 RNase DNase 的离心管和枪头；
3. PBS (25×) 使用时需稀释到 1×。

2. 细胞裂解与 RNaseT1 消化

- ①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；
- ②将细胞裂解液在 4°C、13 000 g 离心 15 min，弃沉淀；
- ③上清中加入 6 μL RNase T1 (终浓度 1 U/μL)，22°C 水浴 15min 后，立即冰浴 5min；④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

- ①IP 组加入 5~10 μg 特异性目的抗体 (或 5~10μL IgG 抗体)，在垂直混匀器上 4°C、15 r/min，过夜孵育。
- ②IP 组磁珠准备：取 40μL ProteinA/G Beads 到 1.5 mL EP 管中，加入 1 mL 1×Cell lysis buffer，轻轻吹打混匀后置于磁力架上吸附磁珠，去除上清，重复清洗磁珠 1 次；
- ③IP 组磁珠加入 40 μL 1×Cell lysis buffer 重悬；
- ④将磁珠加入到相应的 IP 组中，4°C 旋转孵育 3 h；
- ⑤将孵育完的离心管置于磁力架上，吸附 20~30 s，倒弃上清，加入 1 mL 1×IP wash buffer，颠倒混匀 10 次后，将磁珠转移到 1.5 mL EP 管中，置于磁力架上，吸附 20~30 s，倒弃上清；
- ⑥重复上一步骤洗涤 2 次。

注意：

1. 在充分收集磁珠的情况下，尽量缩短磁力架上收集磁珠时间，防止磁珠聚集板结。
2. IgG 抗体浓度为 1 μg/μL。

4. DNase I 消化

- ①将 EP 管置于磁力架上，吸附磁珠 20~30 s，倒弃上清，加入 100 μL 1×IP wash buffer 和 20 μL DNase I；
- ②37°C 水浴 15 min 后，立即冰浴 5 min；
- ③将 EP 管置于磁力架上，吸附磁珠 20~30 s，倒弃上清，加入 200 μL 1×IP wash buffer 洗涤磁珠 3 次后，在磁力架上吸附，去上清；
- ④IP 组加入 100 μL 1×Cell lysis buffer。

5. 蛋白消化与 RNA 提取

- ①取 Input 组，加入 10 μL Proteinase K；取 IP 组，加入等体积 (100 μL) 2×Proteinase K buffer 与 10 μL Proteinase K；
- ②55°C 水浴消化 30 min；磁力架上吸附磁珠 20~30 s，转移上清至新的无 RNase 管中；
- ③向消化后的溶液加入 0.8 mL Trizol，用力摇匀 15 s 后，加入 160 μL 氯仿，再次用力摇匀 15 s 后，冰上放置 2 min；

- ④4°C、12 000 g 离心 10 min;
- ⑤转移上清至新的 2 mL 无酶 EP 管中, 加入 2 倍体积的异丙醇, -80°C 过夜沉淀;
- ⑥4°C、12 000 g 离心 10 min;
- ⑦弃上清, 加入 1mL 75% 乙醇 (无酶水配制), 洗涤沉淀 1 次;
- ⑧4°C、12 000 g 离心 10 min;
- ⑨小心弃上清, 室温晾干 10 min, 将乙醇全部挥发;
- ⑩加入 20 μ L ddH₂O (RNase DNase free), 溶解 RNA, -80°C 保存备用。

注意: 1. 水浴消化期间, 每隔 5min 轻弹离心管底部使磁珠悬浮;
2. 自备试剂: Trizol、氯仿、异丙醇、75% 乙醇 (无酶水配制)。

7. 高通量测序

RNA 进行高通量测序。

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。

