

CLIP-qPCR试剂盒

Crosslinking Immunoprecipitation (CLIP) Kit for qPCR

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

序号	试剂	货号及规格			储存
		IRR039 (6T)	IRR039M (12T)	IRR039L (24T)	
01	PBS (25x)	7.5mL	15mL	30mL	4°C
02	Protein A/G Beads	49.15mL	98.3mL	196.6mL	4°C
03	Cell lysis buffer	0.24mL	0.48mL	0.96mL	4°C
04	IP Wash buffer	26.5mL	53mL	106mL	4°C
05	2x Proteinase K buffer	0.6mL	1.2mL	19.2 mL	4°C
06	100x DTT	0.36mL	0.72mL	2.4mL	-20°C
07	100x Protease inhibitor	0.36mL	0.72m	1.44mL	-20°C
08	IgG	3μL	6μL	1.44mL	-20°C
09	RNase T1	36μL	72μL	12μL	-20°C
10	DNase I	0.12mL	0.24mL	0.15mL	-20°C
11	Proteinase K	0.12mL	0.24mL	0.48mL	-20°C
12	2xmiRNART Mix	0.12mL	0.24mL	0.48mL	-20°C
13	HiScript miRNA Enzyme Mix	25μL	50μL	100μL	-20°C

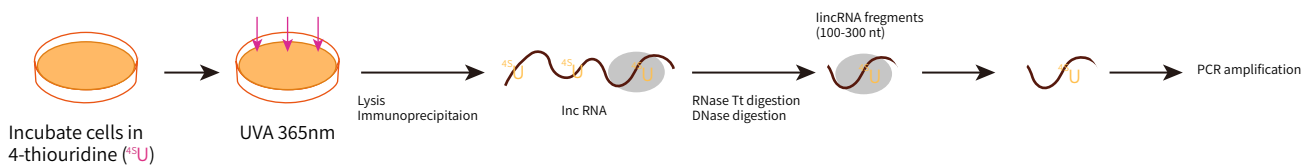
14	ddH ₂ O (RNase DNase free)	0.34mL	0.67mL	1.34mL	4°C
15	RNase-free water	0.36mL	0.72 mL	1.44mL	4°C

产品简介/Product Description

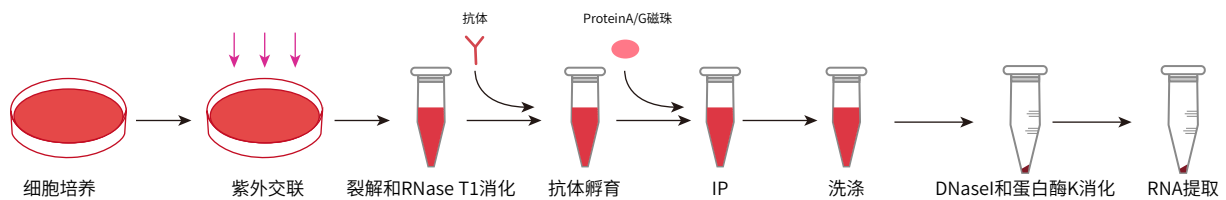
CLIP (crosslinking-immunoprecipitation) 是利用蛋白质和 RNA 在 365 nm 紫外光照射下会发生共价交联的特性，来研究蛋白质和 RNA 相互作用的重要技术。CLIP-qPCR (crosslinking-immunoprecipitation and qPCR) 即紫外交联免疫沉淀结合 qPCR 定量技术，通过免疫共沉淀 RBP 与 RNA 的结合复合物，获取消化 (蛋白酶 K、DNaseI、RNase T1) 后的 RNA，对 RNA 3' - 端加接头，以及设计不同位点的引物，进行 RNA 结合蛋白位点的富集效率检测。

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

- 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×PBS (将 PBS(25×) 稀释至 1×) 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 (Spectronics Corporation)) 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×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°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。
- 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；
- 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 (Spectronics Corporation)) 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°C、500 g 离心 5 min，去除上清；

③向细胞沉淀加 5 mL 1×PBS，重悬，4°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 5~10 μL 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 40 μL 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℃、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℃过夜沉淀;
- ⑥4℃、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℃、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℃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)。

6. 3' - 端加接头及逆转录

- ①在 PCR 管中配制加接头体系: 10 μ L 2 $\times$ miRNA RT Mix、2 μ L HiScript miRNA Enzyme Mix、1 μ L 模板 RNA, 加 ddH₂O (RNase DNase free) 补至 20 μ L;
- ②反应程序: 37℃ 1 h、85℃ 5 min。

7. 引物设计

根据目的基因的种属及名称, 在 NCBI 数据库查询参考核苷酸序列, 采用 Primer 3.0 Input 每 100 bp 设计 1-2 条上游引物, 下游引物采用加尾通用引物, 即 PCR Reverse Primer, 用于 qRT-PCR 实验。

8. qPCR

- ①反应体系配制: 10 μ L 2 $\times$ SYBR Mater Mix、1 μ L PCR Forward Primer (10 μ M)、1 μ L PCR Reverse Primer (10 μ M)、2 μ L cDNA 模板、加 ddH₂O 补至 20 μ L;
- ②反应程序: 95℃预变性 5 min; 45 个循环: 95℃变性 15 s、60℃退火 20 s、72℃延伸 20 s, 采集荧光信号; 70~95℃变性溶解曲线;
- ③结果分析: Δ Ct 公式为: Δ Ct=Ct[IP]- (Ct[Input]-4.9), $2^{(-\Delta$ Ct)} 为以 2 为底, 以 $-\Delta$ Ct 为幂值, 得到富集效率 % Input; $\Delta\Delta$ Ct 公式为: $\Delta\Delta$ Ct=(Δ Ct[IP]- Δ Ct[IgG]), $2^{(-\Delta\Delta$ Ct)} 为以 2 为底, 以 $-\Delta\Delta$ Ct 为幂值, 得到富集倍数 Fold Enrichment。

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。

