

产品介绍

ChIRP(Chromatin Isolation by RNA Purification)是一种同时分析 lncRNA、蛋白及 DNA 三者互作关系的实验方法。利用 lncRNA ChIRP probe 可在全基因范围内定位 lncRNA 的结合位点和可能结合的其他 RNA 分子,结合蛋白质组学技术,可鉴定 lncRNA 在染色质水平所结合的蛋白质。锐博生物发挥自身优势,特向广大用户推出 Ribo™ ChIRP Probe 设计及合成服务。这些由特异反义核酸序列组成的 ChIRP 探针,能与 lncRNA 高效杂交,利用链霉素和素磁珠获得与目标 lncRNA 结合的染色质复合物,进而纯化出相关的 RNA, DNA 和蛋白质,用于后续 lncRNA 的分子作用机制研究。

产品特点

- ◆ 设计优,多位点探针优化设计,全面提升杂交特异性
- ◆ 覆盖全,lncRNA 全链完整覆盖,有效保证杂交效率

使用领域

- ◆ lncRNA 结合蛋白鉴定
- ◆ lncRNA 染色体结合位点鉴定
- ◆ lncRNA 转录调控机制探索

实验前准备

按所提供的 ChIRP 探针序号将探针分成偶数组和奇数组,将所有探针使用无 RNase 无 DNase 超纯水溶解至 100 μ M,将偶数组探针混合在一起,同样的,将奇数组的探针也混合在一起,形成两个探针库,每个探针库里所有探针的总浓度为 100 μ M。实验中,使用这两个探针库平行进行实验,互为对照。探针可以第一次实验临用前配制并分装保存和使用。

注:若使用 ChIRP 试剂盒,请参考试剂盒对探针准备的要求进行准备。

以下为参考 Chromatin Isolation by RNA Purification (ChIRP) (doi: 10.3791/3912, PMID: 22472705) 文献的做法进行的探针准备及实验,若使用试剂盒,请参考试剂盒说明书。

使用流程

一. 收获细胞

收集将用于 ChIRP 实验的细胞。

1. 在组织培养板或烧瓶中培养细胞达到融汇状态。用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗一次并进行胰蛋白酶消化。用大于 2x 体积的培养基终止胰蛋白酶作用,吹打细胞使之重新悬浮成单细胞悬液。将所有培养基和重新悬浮的细胞转移到 50ml Falcon 管中。每个 ChIRP 样品大概有 2000 万个细胞即可。

2. 在 800RCF 条件下离心细胞 4 分钟。去除培养基后,将 4000 万细胞重新悬浮在 40 毫升的 PBS 中,如果需要的话,可合并 Falcon 管。接着在 800RCF 下离心细胞 4 分钟,轻轻倒出 PBS,小心吸取除去剩余液体。

二. 交联细胞和收集细胞沉淀

用戊二醛交联步骤一的细胞以维持 RNA-染色质的相互作用,并进行细胞沉淀。

1. 在室温下进行所有步骤。

2. 用常温 PBS 配制 1% 的戊二醛溶液。每 1000 万个细胞需要 10 毫升 1% 戊二醛溶液(0.4 毫升 25% 戊二醛溶液+ 9.6 毫升 PBS)。戊二醛须现配现用。

3. 轻敲 Falcon 管的底部使细胞沉淀松动。用 1% 的戊二醛重新悬浮细胞沉淀,先用小体积的溶液混合,避免出现大块混合物,

待细胞沉淀基本混合后加足量 1% 戊二醛溶液，上下颠倒混合。在振荡器或旋转器上在室温下交联 10 分钟。

1. 在室温下用 1/10 体积的 1.25 M 甘氨酸溶液终止交联反应 5 分钟。
2. 在 2000RCF 条件下旋转 5 分钟。吸弃上清液，用 20mL 冷冻的 PBS 洗涤细胞沉淀一次，在 2000RCF 下旋转 5 分钟。
3. 吸弃上清液，每 20 万个细胞用 1ml 冷冻 PBS 重悬已交联的细胞沉淀。分装至 Eppendorf 管，每管 1 毫升，并在 4℃ 以 2000RCF 旋转 3 分钟后尽量移除多余的 PBS。
4. 在液氮中快速冷冻细胞团块，并储存在 -80℃。

三. 细胞裂解

溶解交联的细胞，制备细胞裂解物。

1. 在室温下解冻冷冻细胞团块，加入 PBS 使细胞重新均匀悬浮。在 4℃，2000RCF 条件下离心沉淀 3 分钟。使用 10 μ L 移液器去除剩余的 PBS。
2. 用电子天平（精确到 1mg）称出空 Eppendorf 管的质量与带有细胞沉淀的 Eppendorf 管质量。称量并计算并记录细胞沉淀的重量。一个直径 15cm 的培养皿所含的交联 HeLa 细胞通常重 100mg。
3. 用现配的蛋白酶抑制剂 PMSF 和 Suprase-in（参见缓冲液附表）加入无添加的裂解缓冲液配制补充裂解缓冲液（10X 的细胞沉淀质量，例如每 100mg 对应 1 毫升），充分混合。
4. 向每个管中加入 10 倍体积的补充裂解缓冲液并重悬沉淀。若细胞沉淀质量 < 25mg，用 250 μ L 补充裂解缓冲液重悬。悬浮液应该无明显细胞块。否则，将悬浮液分成 500 μ L 等分试样，并使用电动颗粒混合器破碎团块。随后立即进行下一步超声处理。

四. 超声处理

用超声处理交联的细胞裂解物，剪切 DNA。

1. 用 Bioruptor 超声处理 15ml Falcon 管中的细胞裂解物。每个试管中的裂解物应少于 1.5 ml。为了保证超声处理的效率，每次超声波处理不超过两个试管。
2. 在 4℃ 水浴中以 30 秒开启，45 秒关闭脉冲间隔在最高设定下进行超声处理。每 30 分钟检查一次裂解物。继续超声处理，直到细胞裂解液不再浑浊。可能需要 30 分钟到 4 小时。样品管数量，样品体积，水浴温度和超声处理时间将影响该过程所需时间。每个管超声处理的速度可能不同，所以需要每隔 30 分钟将它们集中在一起，并重新分配到原始管中以确保均匀性。注意：超声处理戊二醛交联的细胞比等量的甲醛交联的细胞需要更长时间。
3. 当裂解物变澄清时，将 5 μ L 裂解物转移到干净的 Eppendorf 管中。加入 90 μ L DNA 蛋白酶 K (PK) 缓冲液（见缓冲液列表）和 5 μ L PK。用漩涡振荡器混匀后快速离心使之沉淀。在 50℃ 孵育 45 分钟。
4. 用 Qiagen PCR 纯化试剂盒提取 DNA。用 30 μ L Qiagen 洗脱缓冲液 (EB) 洗脱 DNA，并用 1% 琼脂糖凝胶胶检查 DNA 大小。如果大部分 DNA 是 100-500bp，则超声处理完成。否则需继续超声处理。
5. 在 16100RCF, 4℃ 条件下离心超声处理后的样品 10 分钟。将上清液合并，分装入 1mL 样品管中并在液氮中快速冷冻，-80℃ 储存。

五. ChIRP

将生物素化的 DNA 探针与 RNA 杂交并分离结合的染色质。

1. 在室温下解冻染色质管。
2. 准备杂交缓冲液（见缓冲液列表，每毫升染色质准备 2 毫升），充分混合。
3. 取 1 ml 裂解物，加入 10 μ L RNA INPUT 和 10 μ L DNA INPUT 并置于 Eppendorf 管中。置于冰上做下一步使用。
4. 将剩余的 1mL 染色质转移到 15mL Falcon 管中，每管添加 2 ml 杂交缓冲液。若总体积小于 1.5 毫升则使用 Eppendorf 管。
5. 在室温下解冻探针。若长时间没有使用 Nanodrop 探针，请检查数量（100 μ M 探针应该使用单链 DNA 设置 ~500-600 ng/ μ L）。加入适当体积的探针于管中（每 1ml 染色质样品加入 100 pmol 探针，即每 1ml 染色质加入 1 微升 100 pmol/ μ L 探针），充分混合。在 37℃ 振荡培养 4 小时。
6. 在杂交时间剩余 20 分钟时，准备 C-1 磁珠（储存在 4℃）。每 100 pmol 探针使用 100 μ L 磁珠。用 1mL 未补充的裂解缓冲液洗涤三次，使用 DynaMag-2 磁条将磁珠从缓冲液中分离。

7. 将磁珠重悬于原始体积的无添加裂解缓冲液中；加入现配的 PMSF, P.I 和 Superase-in。4h 的杂交反应完成后，向每个管中加入 100 μ L 磁珠，充分混合。在 37 $^{\circ}$ C 条件下振荡孵育 30 分钟。
8. 准备清洗缓冲液（每个样品 5 mL），充分混合并预热至 37 $^{\circ}$ C，使用前添加 PMSF。
9. 用 1mL 洗涤缓冲液洗涤磁珠 5 次。第一次洗涤时，使用 DynaMag-15 磁条分离磁珠，轻轻倒出，并用 1mL 洗涤缓冲液重新悬浮。将磁珠转移至新的 1.5mL Eppendorf 管后在 37 $^{\circ}$ C 下振荡培养 5 分钟。
10. 在微量离心机上离心所有样品，将样品置于 DynaMag-2 磁条上 1 分钟。倒出样品，用 Kimwipe 擦干，用 1mL 洗涤缓冲液重新悬浮，在 37 $^{\circ}$ C 下振荡培养 5 分钟。重复五次洗涤。
11. 充分重悬磁珠，吸取 100 μ L 用于 RNA 抽提，剩余 900 μ L 用于 DNA 抽提。将所有试管放在 DynaMag-2 磁条上，并除去洗涤缓冲液。简单离心所有管子；把所有试管放在磁条上并清除所有洗涤缓冲液。

六. RNA 抽提

从 ChIRP 样品中抽提 RNA 碎片并用 qRT-PCR 定量。

1. 取 100 μ L 磁珠和 10 μ L RNA INPUT 样品。将 85 μ L RNA PK 缓冲液 pH 7.0 加入至 RNA INPUT，在 95 μ L RNA PK 缓冲液 pH 7.0 中重悬磁珠，随后加入 5 μ L 蛋白酶 K，在 50 $^{\circ}$ C 下用振荡培养 45 分钟。
2. 快速离心所有试管，在 95 $^{\circ}$ C 下加热器中加热样品 10 分钟。
3. 在冰上冷却样品，加入 500 μ L TRIzol，剧烈振荡 10 秒。在室温下孵育 10 分钟后储存在 -80 $^{\circ}$ C 或进入步骤 4。
4. 向 TRIzol 处理的样品中加入 100 μ L 氯仿。剧烈振荡 10 秒。用台式离心机在 16100RCF，4 $^{\circ}$ C 条件下离心 15 分钟。
5. 去除大约 400 μ L 含水上清液，避免碰到有机物和分界面。
6. 加入 600 μ L (1.5 体积) 的 100% 乙醇并充分混合。通过 MIRNeasy 小型纯化柱离心纯化样品。按照 MIRNeasy 小型试剂盒说明书用 RWT 清洗 1 次，RPE 清洗 2 次。用 30 μ L 无核酸的水洗脱。
7. 按照说明书步骤处理 RNA 洗脱液。反应完成后，在 65 $^{\circ}$ C 条件下加热样品 15 分钟使所有 DNA 酶完全失活。
8. 使用 1 μ L RNA 分离物进行 qRT-PCR 分析以确认 lncRNA 回收情况。一般用 GAPDH 作阴性对照。RNA 分离物也可以用于制备 RNA 测序 (RNA-Seq) 文库。

七. DNA 抽提

从 ChIRP 样品中提取 DNA 碎片并用测序鉴定或用 qPCR 定量。

1. 准备 DNA 洗脱缓冲液（见缓冲液列表），每个样品 150 μ L（包含 DNA INPUT）。
2. 每毫升 DNA 洗脱缓冲液加 10 μ L RNA 酶 A (10mg / mL) 和 10 μ L RNA 酶 H (10U / μ L)，充分混合。
3. 用 150 μ L 含 RNases 的 DNA 洗脱缓冲液重新悬浮每个磁珠样品。（将 DNA INPUT 重悬于 140 μ L 洗脱液中）37 $^{\circ}$ C 振荡培养 30 分钟。
4. 在 DynaMag-2 磁条上分离磁珠和上清液，吸取上清液，将磁珠加入标记好的管中。
5. 准备与第 2 步中所述完全相同的 DNA 洗脱缓冲液 (10 μ L RNase A (10 mg / mL) 和 RNaseH (10 U / μ L))。每个样品加入 150 μ L (包含 DNA INPUT)，37 $^{\circ}$ C 振荡培养 30 分钟，在 DynaMag-2 磁条上分离磁珠和上清液，收集所有上清液（包括步骤 4. 的上清，大约 300 μ L）。
6. 每个上清样品添加 15 μ L PK，在 50 $^{\circ}$ C 下振荡培养 45 分钟。
7. 预离心黄色锁相凝胶管 (5PRIME)。转移 DNA 样品到锁相凝胶管，并向每个样品中加入 300 μ L PhOH；氯仿；异戊醇。剧烈振荡 10 分钟，然后在 4 $^{\circ}$ C，16100RCF 的台式离心机上离心 5 分钟。去除上清液（大约 300 μ L），加入 3 μ L GlycoBlue，30 μ L NaOAc 和 900 μ L 100% EtOH。充分混合并在 -20 $^{\circ}$ C 保存过夜。
8. 在 4 $^{\circ}$ C，16100RCF 条件下离心样品 30 分钟。
9. 小心去除上清液，加入 1mL 70% EtOH 并振荡混合。在 16100RCF 下旋转 5 分钟，用移液管除去上清液，风干 1 分钟后，重悬于 30 μ L LEB 中。
10. 所得 DNA 样品可用于 qPCR 分析或按照 Illumina 方案制备高通量测序文库。

表 1 缓冲液列表

<p>Buffer List:</p> <p>Dissolve a pellet of complete protease inhibitor in 1 ml water as 50x stock. Make 100 mM PMSF in isopropanol (100x stock). Superase-in is used as 200x stock. Store all at -20 °C.</p>
<p>Lysis Buffer:</p> <p>50 mM Tris-Cl pH 7.0 10 mM EDTA 1% SDS Always add PMSF, P.I. and Superase-in fresh before use except when washing beads</p>
<p>Proteinase K Buffer (for DNA)</p> <p>100 mM NaCl 10 mM TrisCl pH 8.0 (For RNA use pH 7.0) 1 mM EDTA 0.5% SDS Add 5% by volume Proteainse K (Ambion AM2546 20 mg/ml) fresh before use</p>
<p>Hybridization Buffer</p> <p>750 mM NaCl 1% SDS 50 mM Tris-Cl pH 7.0 1 mM EDTA 15% formamide (store in the dark at 4 °C) Always add PMSF, P.I. and Superase-in fresh before use</p>
<p>Wash Buffer</p> <p>2x NaCl and Sodium citrate (SSC) (diluted from 20x SSC Invitrogen stock) 0.5% SDS Always add PMSF fresh before use</p>
<p>DNA elution Buffer</p> <p>50 mM NaHCO₃ 1% SDS</p>

