

Magna ChIRP 详细操作步骤

假如您未曾使用过Magna ChIRP技术，请在开始前仔细阅读理解详细的实验方案
本版实验方案包含重要的细节和有价值的建议，有助于取得更成功的实验结果。
对于高阶的用户，可以直接参阅20页的简版实验方案。

捕获探针的设计

设计反义生物素化的DNA探针利用ChIRP方法选择性回收RNA靶标

1. 采用以下参数设计反义寡聚探针

a. 探针数量：1 probe / 100 nt RNA

b. 靶标GC含量：45%

c. 寡核苷酸长度：20 nt

d. 间隔序列长度：60-80 nt

可利用在线探针设计程序，如www.singlemoleculefish.com

假如对于探针设计程序而言RNA序列过长，可以将其分段，忽略高重复或具有广泛同源性序列

2. 根据探针对应于靶RNA的位置，将其标记序号 (1,2,3,4,5...)。将生物素化的探针分成两组 (奇数组和偶数组)，偶数组所包含探针编号为2, 4, 6...，奇数组所包含探针编号为1, 3, 5...。

表1 奇数及偶数组探针

Probe No.	1	2	3	4	5	6	7	8	-----	-----
even pool		x		X		x		x		
odd pool	x		x		x		x			

3. 确保奇数组和偶数组的探针之间同源的寡核苷酸序列不超过13 bp。

这对于CHIRP-seq分析尤其重要。假如分别来自两组中的探针有超过13 bp同源序列(无论正义链或反义链),它们可以同时杂交结合到基因组DNA的相同位置,当测序数据叠加分析时,就会在同源序列匹配的基因组位置形成假阳性的峰。

可以利用在线基序搜寻程序,如MEME (<http://meme.nbcr.net/meme/>)

载入所有探针序列,允许搜索正向及反向互补序列,并寻找两个探针组中探针之间任何显著性的重叠序列。

4. 合成3'末端带有BiotinTEG的反义DNA探针。

5. 准备相同浓度的所有探针。

6. 等体积混合同组中相同浓度的探针,假如必要的话,进一步稀释至50 μ M(总寡核苷酸浓度)。

每一组探针混合物分成几份保存于-20度,以避免反复冻融。每次反应需探针混合物2 μ L。

所有实验利用两组探针混合物,两组互为内部对照。依赖于RNA的真实可信的信号会在两组中同时存在,而非特异的杂交信号将只存在于某一组。这对ChIRP-qPCR 和 ChIRP-seq 同时适用。

靶标RNA的绝对表达水平对于实验成功非常重要,采用qPCR检测,100ng总RNA中,靶标RNA的Ct值应该低于23。

A 准备ChIRP实验要求的裂解物

计算ChIRP反应的数量。对于每个感兴趣的RNA靶标用1份奇数组探针,1份偶数组探针,以及一份阴性对照探针。Magna ChIRP Kits (Cat. # 17-10494 and

17-10495) 含有阴性对照探针组(Magna ChIRP Negative Control Probe Set (LacZ) 50 μ M; Part # CS216572)。假如你正用EZ-Magna ChIRP kit (Cat. # 17-10495) , 其中会包含一套阳性对照探针(Magna ChIRP TERC IncRNA Probe Set (Even) 50 μ M; Part # CS216575 and Magna ChIRP TERC IncRNA Probe Set (Odd) 50 μ M; Part # CS216563)。阴性或阳性对照探针组也可以单独购买。

请参考英文版实验手册第31页的相应产品的订购信息。

一个典型的ChIRP反应 (例如 , 利用一组探针进行一次染色质纯化反应) 要求来源于 1.0×10^7 细胞 (一个15 cm板) 约1mL染色质。一个ChIRP反应需要的裂解缓冲液体积的计算基于收获细胞团的重量。细胞种类的不同其重量也会有差异。表2中列举了不同培养规格Hela细胞数量及所需裂解缓冲液的体积

Table 2. Approximate volumes of lysis buffer per cell culture vessel (HeLa cells)

Type of vessel	Surface Area (cm ²)	Cell Number	Volume of Lysis Buffer (μ L)
T-75	75	$\sim 0.5 \times 10^7$	500
T-225	225	$\sim 1.3 \times 10^7$	1300
10 cm plate	78.5	$\sim 0.5 \times 10^7$	500
15 cm plate	176.6	$\sim 1.0 \times 10^7$	1000

某些情况下 , 细胞数量或染色质总量要求可能需要按照经验进行优化。但对初次实验 , 我们推荐采用以下实验步骤中建议的染色质总量。一旦针对靶标RNA的初次ChIRP实验取得阳性结果 , 每个ChIRP反应的染色质总量可以适当降低或根据需要进一步优化。

每个ChIRP反应的细胞总数或染色质总量可以依据靶标RNA的丰度 , DNA回收率 , 以及下游检测方法进行优化。

B RNA/DNA和蛋白 (染色质) 的体内交联

1. 准备细胞。两个15cm培养板中贴壁哺乳动物细胞生长至80%到90%，进行刺激或必要的处理。每板细胞包含20ml培养基。额外单独培养一板细胞用于评估细胞数量。假如用悬浮细胞，对40ml培养体系中 2×10^7 细胞进行刺激或处理。

对于HeLa细胞，两个15cm培养板约 2×10^7 细胞。这足够用于两个典型的ChIRP反应(奇数组探针和偶数组探针)。细胞数量可以根据兴趣探针的表现进行调整，从而优化得到相应于阴性对照组(LacZ探针或阴性RNA对照)最高的信噪比。本实验方案采用 1×10^7 细胞进行一个ChIRP反应，以确保应用对照探针时表现最优。

注意，奇数组探针和偶数组探针分别用于单独ChIRP反应，因而对每个RNA靶标来说，需要 2×10^7 细胞 (奇数组探针和偶数组探针各需 1×10^7 细胞)。阴性对照探针组反应需要额外的 1×10^7 细胞进行。

本试剂盒提供的缓冲液的体积足以完成多达14个15 cm培养板的细胞染色质的制备。表2以外其他规格培养器皿的细胞染色质分离可以进行微调。

2. 胰酶消化和收获细胞 (针对悬浮细胞直接进入第3步)

a. 预热PBS，0.25%胰酶-EDTA，完全细胞培养基，以及新鲜25%戊二醛储存液至室温。每 2×10^7 细胞准备22 ml的预冷PBS (第12步和15步备用)。

每次使用新鲜高质量的戊二醛(分子生物学级别)。不要使用以前开封的戊二醛。

b. 吸出培养基，以10 mL PBS漂洗，每培养板用5ml 0.25% 胰酶/EDTA 消化。

c. 于37 °C温浴培养板2-3分钟。光学显微镜下监测细胞形态。当细胞开始变圆，轻轻弹敲使细胞完全脱离瓶壁。如果轻轻敲后细胞无法解离，再继续37 °C温浴2-3分钟直至细胞完全解离。

- d. 每板加入10ml 完全培养基中和胰酶，反复吹吸解离细胞团块，将所有培养液转移至50ml离心管重悬。
3. 800 x g离心5分钟沉淀细胞。弃上清，将 2×10^7 细胞重悬于20ml PBS。必要的话合并离心管（最多每离心管 4×10^7 或40ml细胞）。
4. 800 x g离心5分钟沉淀细胞。
5. 弃上清。
6. 细胞重悬于1%戊二醛/PBS。
 - a. 室温下每 2×10^7 细胞准备20mL 1%戊二醛/PBS (0.8 mL 25%戊二醛储存液稀释于19.2 mL PBS)。
 - b. 弹敲50ml离心管底解离细胞沉淀。每 2×10^7 细胞重悬于20mL 1%戊二醛/PBS，上下颠倒数次混匀。以10ml 移液管上下吹吸数次使细胞沉淀充分重悬。
7. 于水平或旋转摇床室温(18-25 ℃)孵育10分钟。
8. 每20mL 1%戊二醛/PBS添加2mL 10x甘氨酸(Part # CS207370)以中止过量的戊二醛。颠倒离心管数次混匀。
9. 于水平或旋转摇床室温(18-25 ℃)孵育5分钟。
10. 2000 x g离心5分钟沉淀细胞。
11. 尽可能尽弃上清，不要扰动细胞沉淀。
12. 每 2×10^7 细胞以20 mL预冷PBS重悬。
13. 2000 x g离心5分钟沉淀细胞。
14. 小心弃上清。
15. 以2ml预冷PBS重悬重悬洗涤并交联过的细胞沉淀（ 2×10^7 细胞）。
16. 每ml PBS细胞重悬液转至1.5mL EP管。

17. 于4 °C 2000 x g离心3分钟沉淀细胞。枪头小心移除上清避免吸到细胞。
18. 此步细胞沉淀可以液氮速冻保存于-80 °C，或继续细胞裂解和超声。

C. 细胞裂解

假如已经优化了超声条件，直接进行C。否则参见附录A优化超声条件指南。

1. 如果必要，冰上融化-80 °C冻存的细胞团。
2. 用力弹敲使细胞团解离并混匀。于4 °C 2000 x g离心3分钟。
3. 用10-20 μ L尖枪头尽可能移除残留PBS。
4. 每份细胞团称重。
 - a. 在电子天平（1mg精度）称重空EP管（通常净重1g）。
 - b. 称重每份细胞沉淀，记录重量。一满板（15cm）交联的HeLa细胞一般重100 mg
5. 每100mg细胞沉淀物准备1.0 mL完全裂解缓冲液，添加5 μ L 200X蛋白酶抑制剂混合物III (Part # 535140-1ML)，5 μ L RNA酶抑制剂 (Part #CS216144) 至裂解缓冲液 (Part # CS216587)，混匀。

典型的ChIRP实验（奇数探针组和偶数探针组）要求2.0 mL完全裂解缓冲液和总计200 mg的细胞沉淀物。一个隐形对照（LacZ）要求另外1.0 mL完全裂解缓冲液和总计100 mg的细胞沉淀物。

6. 每100mg细胞团块重悬于1.0mL的完全裂解缓冲液。重悬过程要轻。

推荐细胞浓度不高于100mg/mL，因为裂解液与细胞密度的比例对于细胞裂解的可靠性很重要。对于<25mg的小细胞团块，重悬于250 μ L裂解液。
7. 立即进入D章节，超声片段化DNA。

D. 超声片段化DNA

重要事项：将交联的DNA片段化至~100-500 bp长度需要确定最优化的条件。典型的操作步骤请参考附录A。一旦优化了片段化条件，开始如下操作步骤。下述步骤利用了水浴型超声仪(Q800R Sonicator, Qsonica)进行，这只是一个例子。

1. 细胞裂解物超声。

- a. 将所有C章节，第6步中的细胞裂解物置于15mL离心管中。假如需要，可以留下5 μ L 的裂解物用于微流体电泳（如Agilent Bioanalyzer）或琼脂糖凝胶电泳，与本章节第4步相应的超声片段化的染色质样本一起，分析未片段化的染色质情况。
- b. 用水浴型超声仪超声细胞裂解物。如下条件为利用Qsonica Q800R对HeLa细胞进行优化。
- c. 将50 μ L至0.7mL的裂解物转移到每个超声管中。4 $^{\circ}$ C水浴条件，65%能量级别，开启15秒，关闭45秒，脉冲超声2小时（实际超声，总时间8小时）。

超声效率取决于细胞类型，细胞数量，和仪器状态。如果可能，咨询求教仪器操作人员指导。为了提供可视化的参考，HeLa细胞染色质被合适片段化以用于ChIRP试剂盒的超声例子在图7中显示。

保持超声水浴为冰冷条件。超声产生热量，可以变形染色质。超声循环间隔至少45秒防止样本过热导致的RNA或DNA破坏。注意不同管中裂解物常以不同速度超声。假如可能的话，每隔30分钟混合并重新分配样本至不同管中从而确保均一性。

戊二醛交联的细胞比甲醛交联的细胞所需要的超声时间更长。

Qsonica Q800R超声仪延长超声时间后聚苯乙烯管易破裂，**推荐每超声1小时**

(或4小时的总时间) 后换新的管子。

2. 超声过的细胞裂解物于4 °C , 16,100 x g , 离心10分钟。
3. 合并上清。将每1mL 上清转移至新EP管。于液氮中速冻并保存于-80 °C。若需要, 取5 μ L 裂解物进行微流体电泳 (例如, Agilent Bioanalyzer) 或琼脂糖凝胶电泳以分析DNA片段化情况。

如果当天分析, 样本保存于冰上, 否则样本保存于-80 °C。

片段化的交联染色质可于-80 °C保存长达3个月。

避免额外的冻融循环以防止蛋白和RNA降解。

4. (可选) 按照附录A中第V到XI步所描述, 分析本章节第1a步和第3步中未片段化和片段化的染色质样本。

E. RNA纯化分离染色质

开始前重要考量因素 :

反应体积

对于典型的ChIRP反应, 1mL超声细胞裂解液用2mL完全杂交缓冲液稀释。每次实验都可以对超声细胞裂解物用量, 反应体积进行优化, 只要保持裂解物与完全杂交缓冲液体积比为1 : 2。如果样本体积小于1.5mL, 就用EP管操作。

探针用量

对于典型的ChIRP反应, 每1mL超声细胞裂解物推荐用100 pmol的总探针 (50 μ M探针, 2 μ L)。若探针储存过久, 需利用Nanodrop对浓度重新测定 (50 μ M探针在单链DNA测定条件下测定值应该约为250-300 ng/ μ L)。

PureProteome Streptavidin磁珠

每100 pmol探针推荐用120 μ L PureProteome Streptavidin磁珠.额外的磁珠可增加靶标RNA复合物得率。额外的磁珠考虑用Proteome Streptavidin磁珠 (cat. #LSKMAGT02)。

1. 为即将进行的ChIRP反应标记足够数量的15mL离心管。
2. 室温下融化D步骤中准备的超声细胞裂解物。
3. 转移10 μ L超声细胞裂解物置于新的EP管中，标记为"RNA input"。另外转移19 μ L超声细胞裂解物置于EP管中，标记为"DNA input"。将RNA样本置冰上直到步骤F，将DNA样本置冰上直到步骤G。这些样本分别代表10%的RNA和1%的DNA用量。
4. 37 $^{\circ}$ C温育杂交缓冲液(Part # CS216571)以溶解所有沉淀物。为每mL超声细胞裂解物准备2mL完全杂交缓冲液。假如300 μ L甲酰胺至1.7mL的杂交缓冲液，然后加入10uL 200X蛋白酶抑制剂混合物III (Part # 535140-1ML)加10uLRNA酶抑制剂(Part #CS216144)，混匀。
5. 转移1mL超声细胞裂解物至15mL离心管。
6. 每管加入2mL完全杂交缓冲液并混匀。
7. 室温融化探针。
8. 每管加入2 μ L 50 μ M探针 (100 pmol) 混匀。
9. 于37 $^{\circ}$ C在垂直转子上孵育4小时进行探针杂交。
10. 杂交结束前约20分钟准备PureProteome Streptavidin磁珠。
 - a. 开始前为ChIRP反应标记足够的1.5mL EP管 (奇数探针组，偶数探针组，阴性对照)。

- b. 枪头吹吸或颠倒以完全分散和重悬 PureProteome Streptavidin 磁珠 (Part #CS219080)。保证无可见的结块磁珠。
- c. 加入 120 μ L PureProteome Streptavidin 磁珠至步骤 a 中标记好的每个 EP 管中。
- d. 每EP管加入1mL的裂解缓冲液(Part# CS216587)，混合磁珠并轻轻吹吸几次以完全重悬。将EP管置于磁力架(例如 Millipore Cat.# 20-400)沉淀1分钟。
- e. 移除上清，确保不要吸出任何磁珠。从磁力架移去 EP 管。
- f. 重复步骤 d 和 e，再洗涤两次。
- g. 准备足量的完全裂解缓冲液(100 μ L/每个ChIRP反应)，每99 μ L裂解缓冲液加入 0.5 μ L 200X蛋白酶抑制剂混合物III (Part # 535140-1ML)和0.5 μ L RNA酶抑制剂 (Part # CS216144)。
- h. 每管 100 μ L 完全裂解缓冲液中重悬磁珠。
11. 4 个小时的杂交反应结束后，向每个 ChIRP 反应管中加入第 10 步中准备的 100 μ L PureProteome Streptavidin 磁珠，充分混匀。
12. 持续混合或旋转条件下，于 37 $^{\circ}$ C 再孵育 30 分钟。
13. 孵育的同时，预热洗涤缓冲液(Part # CS216569, 5 mL per reaction)至37 $^{\circ}$ C，并在每15mL离心管中加入25 μ L 200X蛋白酶抑制剂混合物III。
14. 瞬时离心 15mL 反应管以去除管壁残留液滴。
15. 将反应管置于可容纳 15mL 离心管的磁力架上(例如 cat. #LSKMAGS15, or #20-400)，静置 5 分钟。
16. 弃上清，动作小心勿影响磁珠。
17. 将离心管从磁力架取出。
18. 用 1mL 预热的清洗缓冲液清洗磁珠，清洗 4 次。

a. 加入第 13 步准备的 1mL 预热清洗缓冲液，轻轻吹吸数次重悬磁珠以混匀。将磁珠悬液转至 1.5mL 新 EP 管（第一次洗涤）。

b. 37 °C 边混匀边孵育 5 分钟。瞬时离心 EP 管以去除管壁残留液滴。

可在 Eppendorf Thermomixer® system，Labnet Shaking incubator 或标准转瓶杂交炉中进行 37 °C 边混匀边孵育的过程。

c. 将 EP 管置于磁力架 1 分钟，小心弃上清。

d. 将 EP 管移出磁力架，加入第 13 步预热的洗涤缓冲液 1mL，轻轻吹吸数次重悬并混匀磁珠（第二次洗涤）。

e. 37 °C 边混匀边孵育 5 分钟。瞬时离心 EP 管以去除管壁残留液滴。

f. 将 EP 管置于磁力架 1 分钟，小心弃上清。

g. 再重复步骤 d-f 两次（第三次及第四次洗涤）。

弃上清时务必小心不要吸到磁珠。

19. 将 EP 管移出磁力架。加入第 13 步预热的洗涤缓冲液 1mL，轻轻吹吸数次重悬并混匀磁珠（第五次洗涤）。

20. 取足够数量（与 ChIRP 反应数量等同）的 1.5mL EP 管标记，用于后续 RNA 分离。

21. 将每个反应中 100 μ L 的磁珠混悬液转至标记好的 1.5mL EP 管中。该样本将用于 RNA 分离。剩余 900 μ L 的磁珠混悬液将用于 DNA 分离。

22. 37 °C 边混匀边孵育 5 分钟。

23. 将所有 EP 管瞬时离心（包括 RNA 分离和 DNA 分离），置于磁力架 1 分钟。

24. 弃上清。

25. 将所有 EP 管瞬时离心，用尖头的 10-20 μ L 枪头尽弃上清。

26. 将 EP 管置于冰上，立即进入 RNA 分离和 DNA 分离步骤。

F . RNA分离

重要事项：此部分务必确保使用标识为RNA专用的缓冲液。此部分建议使用 QIAGEN miRNeasy® Mini Kit 作为RNA纯化步骤中的一部分。此试剂盒可另外从QIAGEN公司购买。尽管其他RNA纯化试剂盒可能也适用，但QIAGEN miRNeasy® Mini Kit在本操作手册中经过测试可用。

1. 将在E章节第26步收集的100 μ L 磁珠样本（用于RNA分离）和E章节第3步的10 μ L RNA Input 样本（10% input）置于冰上。
2. 用95 μ L RNA专用的蛋白酶K缓冲液(Part. #CS216567)重悬每100 μ L的磁珠样本。
3. 用85 μ L RNA专用的蛋白酶K缓冲液（Part. #CS216567)重悬10 μ L 的RNA Input 样本。
4. 每管加入5 μ L蛋白酶K (Cat. # CS207286)。
5. 将EP管置于50 $^{\circ}$ C持续颠倒混匀孵育45分钟。
6. 瞬时离心并于95 $^{\circ}$ C孵育10分钟。
7. 将EP管置于冰上2分钟。
8. 瞬时离心，每管加入0.5mL Trizol® Reagent，上下吹吸几次使其充分混匀。
9. 室温孵育10分钟。 -80 $^{\circ}$ C储存或直接进入第10步。
10. 每管加入100 μ L 氯仿。
11. 剧烈震荡15秒。

12. 4 °C , 16100 x g , 离心15分钟。
13. 将上层水相 (~400 μL) 转至新的EP管。每个样本转移等体积的上层水相。
14. 每管加入600μL (或1.5倍体积) 100% 乙醇。
15. 吸取700μL样本 , 包括任何沉淀物 , 转至套装2mL收集管的QIAGEN miRNeasy® Mini柱。合上管盖并于室温下 $\geq 8,000 \times g$ 离心15秒。弃滤过液。将剩余样本重复上述过程。
16. 以700 μL的RWT缓冲液洗涤柱子一次 , 并以500μL RPE缓冲液洗两次。
 - a. 加入700 μL的RWT缓冲液至miRNeasy Mini柱。合上管盖 , $\geq 8,000 \times g$ 离心15秒。弃滤过液。使用之前 , RWT缓冲液和RPE缓冲液加入乙醇 (96–100%) (体积参考瓶底标记) 。
 - b. 加入500 μL RPE缓冲液至miRNeasy Mini柱。合上管盖 , $\geq 8,000 \times g$ 离心15秒。弃滤过液。
 - c. 加入500 μL RPE缓冲液至miRNeasy Mini柱。合上管盖 , $\geq 8,000 \times g$ 离心2分钟。
17. 将miRNeasy Mini柱置于新2mL收集管。最高速离心1分钟使膜进一步干燥。
18. 将miRNeasy Mini柱转至1.5mL新收集管。
19. 将30μL无核酶水直接加至miRNeasy Mini柱。合上管盖 , $\geq 8,000 \times g$ 离心1分钟 , 将RNA洗脱下来。
20. 每份样本准备1μL 0.1M EDTA (终止液) , 以4倍体积无核酶水稀释0.5M EDTA(Pat #.CS203175)。
21. 加入3 μL 10X DNase I 反应缓冲液和1 μL DNase I (Pat # CS216565)至上述19步获得的洗脱物。
22. 于37 °C孵育所有样本20分钟。

23. 瞬时离心EP管，加入第20步准备的1 μ L终止液。
24. 于65 $^{\circ}$ C孵育所有样本10分钟。
25. 瞬时离心EP管，置于冰上。进入H章节，qRT-PCR分析，确认RNA回收情况，或者如果必要的话进行下一步RNA测序建库准备（RNA-seq）。

G DNA分离

1. 将在E章节第26步收集的900 μ L 磁珠样本（用于DNA分离）和E章节第3步的9 μ L DNA Input 样本（10% input）置于冰上。
2. 准备足量的完全DNA洗脱缓冲液，对于每份样本和DNA Input 样本：取1.5 μ L RNA酶A (Part #20-297)，1.5 μ L RNA酶H(Part # CS216564)，加至150 μ L DNA洗脱缓冲液(Part #CS216566)。按照表3计算需准备的缓冲液的量。

Table 3. Complete DNA Elution Buffer

Component	x 1	x reaction number
DNA Elution Buffer	150 μ L	150 μ L x _____ = _____
RNase A	1.5 μ L	1.5 μ L x _____ = _____
RNase H	1.5 μ L	1.5 μ L x _____ = _____

3. 将900 μ L 磁珠样本重悬于150 μ L 的完全DNA洗脱缓冲液。
4. 将9 μ L 的DNA input样本重悬于141 μ L 的完全DNA洗脱缓冲液。
5. 将所有样本于37 $^{\circ}$ C持续混合孵育30分钟。
6. 瞬时离心。
7. 将RNA酶处理过的900 μ L磁珠样本置于磁力架1分钟。将DNA Input样本置于旁

边，留待第11步用。

8. 小心将上清转移至新的1.5mL EP管，并置冰上(第一次洗脱)。
9. 为确保DNA被从磁珠完全洗脱，准备另一份含RNA酶A和RNA酶H的完全DNA洗脱缓冲液(如以上第2步所述)。
10. 将每份RNA酶处理过的磁珠样本重悬于150 μ L的完全DNA洗脱缓冲液。
11. 将150 μ L的完全DNA洗脱缓冲液加入以上第7步DNA Input样本。
12. 所有样本于37 $^{\circ}$ C持续混合孵育30分钟。
13. 瞬时离心，并将磁珠样本置于磁力架1分钟。
14. 小心将上清(第二次洗脱)转移至上述第8步中含有第一次洗脱物的EP管(每份样本总体积应该为300 μ L)。
15. 每管洗脱的样本和DNA Input样本加入15 μ L蛋白酶K(Cat. # CS207286)。
16. 于50 $^{\circ}$ C持续混合孵育45分钟。
17. 瞬时离心，并置于室温。

使用前将Phase-Lock凝胶管(5 PRIME, Cat. # 2302810)于12,000 - 16,000 x g离心20-30秒。

18. 将样本转移至Phase-Lock凝胶管。
19. 每份样本加入300 μ L 酚：氯仿：异戊醇(25:24:1, pH 8.0)。
20. 剧烈震荡10分钟。
21. 于4 $^{\circ}$ C，16,100 x g离心5分钟。
22. 将上层水相(~300 μ L)吸出转至新的1.5mL EP管。
23. 加入共沉淀剂(2 μ L Pellet Paint® NF, Cat.# 70748-3; 或5 μ L 线性丙烯酰胺)，接着加入30 μ L 3M乙酸钠和900 μ L 100%乙醇。充分混匀。

24. 冻存于-20 °C过夜。
25. 于4 °C , 16,100 x g 离心30分钟 , 移除上清 , 小心不要碰到沉淀团块。
26. 加入1mL冰预冷的75%乙醇洗涤沉淀一次。于4 °C , 16,100 x g离心5分钟。小心弃上清 , 待沉淀物风干。
27. 将DNA沉淀物重悬于30 μ L 10 mM Tris-HCl, pH 8.5。
28. 制备好的DNA样本可用于qPCR(第H步)或DNA测序文库的构建(DNA-seq)。

H . 定量PCR分析RNA回收和DNA结合情况

用ChIRP试剂盒分离的RNA和DNA可以借助定量PCR分析。一旦确认ChIRP实验中RNA回收及DNA与靶标结合 (假如结合位点已知) 是成功的 , 进一步探索复合物中的DNA靶点可以借助高通量方法如比较芯片或深度测序进行。以下是利用EZ- Magna ChIRP试剂盒 (Cat. # 17-10495)中提供的对照探针对ChIRP实验中RNA回收和DNA结合情况进行实时定量检测的举例说明。证明RNA回收和DNA结合可以利用qPCR分析的相对标准曲线法进行 , 将阴性对照探针 (LacZ) 和阳性对照探针 (TERC) 组的RNA或DNA进行比较 , 或采用比较Ct ($\Delta\Delta$ Ct) 方法 , 对两个种PCR扩增产物进行比较 , 如阳性对照RNA (TERC基因) 和阴性对照结合RNA (GAPDH基因) , 或者阳性对照DNA (WNT前体区) 和阴性对照DNA (GAPDH编码区)。不论采用相对标准曲线法还是比较Ct($\Delta\Delta$ Ct)法 , Input RNA或DNA都是必须的。图2(TERC RNA)显示一个RNA回收成功的例子 ,图3(WNT前体区) 显示以TERC RNA 为靶点的ChIRP实验中DNA结合成功的例子。另见图4(NEAT1 RNA)和图5(NEAT1编码区) ,用lncRNA NEAT1 探针(Cat. # 03-308) 进行ChIRP实验的例子。NEAT1实验基于Simon MD等人已发表文献设计。

I. 一步法实时定量RT-PCR检测RNA。

1. 向PCR板 (适用于选用的实时定量PCR设备) 加入2 μ L RNA样本 , 推荐每个ChIRP样本进行三个复孔qPCR反应。

所有ChIRP或Input样本中35 μ L可用。

20 μ L RT-qPCR反应推荐用2 μ L或更少的ChIRP RNA。

推荐每份Nuclear RIP样本也进行三个复孔qPCR反应。

假如用相对标准曲线法 , 用来自10% Input样本的RNA进行连续4个5倍或10倍梯度稀释 , 利用这些样本制作标准曲线。ChIRP样本的浓度可以按标准曲线计算成Input的百分比。或者如果愿意的话 , 可以计算成相应的细胞数量或纯化RNA的量。

2. 主要反应混合物体系按表4准备。额外配制1管反应液以弥补加样体积损失。对于iTaQ™ Universal one-Step Kits (Bio-Rad)以外的试剂按照说明书建议。

3. 加入18 μ L qPCR混合物至2 μ L样本。

4. 利用盖子或塑料膜密封PCR板 , 开始qPCR反应。

Table 4. 1-Step qRT-PCR setup and running parameters using iTaq Universal One-Step Kit

1-Step qRT-PCR reagent assembly for 1 reaction:		qPCR parameters:	
SYBR® Green Master Mix	10.0 μ L	cDNA Synthesis	50°C 10 min
Reverse Transcriptase	0.25 μ L	Polymerase Inactivation	95°C 1 min
ddH ₂ O	6.75 μ L	Denature	95°C 10 sec
Primer mix	1.0 μ L	Anneal and Extend:	60°C 30 sec
Total	18 μ L		} 40 cycles

II. 实时定量PCR检测DNA

1. 向PCR板 (适用于选用的实时定量PCR设备) 加入2 μ L DNA样本 , 推荐每个ChIRP样本进行三个复孔qPCR反应。

每份ChIRP或Input样本中30 μ L可用。

25 μ L PCR反应推荐用2.5 μ L或更少的ChIRP DNA。

推荐每份Nuclear RIP样本也进行三个复孔qPCR反应。

假如用相对标准曲线法 , 用来自1% Input样本的DNA进行连续4个5倍或10倍梯度稀释 , 利用这些样本制作标准曲线。ChIRP样本的浓度可以按标准曲线计算成Input的百分比。或者如果愿意的话 , 可以计算成相应的细胞数量或纯化DNA的量。

2. 主要反应混合物体系按表4准备。额外配制1管反应液以弥补加样体积损失。

3. 加入23 μ L qPCR混合物至2 μ L样本。

4. 利用盖子或塑料膜密封PCR板 , 开始qPCR反应。

Table 5. qPCR reagent setup and running parameters for DNA Analysis

qPCR reagent assembly for 1 reaction:		qPCR parameters:	
SYBR® Green Master Mix	12.5 μ L	Initial Denature	95°C 3 min
ddH ₂ O	9.5 μ L	Denature Anneal and Extend: } 50 cycles	95°C 15 sec 60°C 1 min
Primer mix	1.0 μ L		
Total	23 μ L		

I RNA/DNA qPCR数据分析

有许多算法可分析ChIRP实验结果 ;两种最常用的方法是相对标准曲线法和 $\Delta\Delta$ Ct法。

a. 用相对标准曲线将RNA浓度标准化成Input的百分比

1. 对于每个目标RNA，用10% (RNA) 或1% (DNA) Input样本制备4个5倍或10倍系列梯度稀释，用上述稀释Input样本，ChIRP样本，以阴性对照探针进行qRT-PCR (或RT-PCR)。
2. 利用qPCR设备制造商的实时检测系统软件计算阈值循环 (Ct) 值。
3. 利用上述Input梯度样本的阈值循环 (Ct) 值建立标准曲线。
4. 利用标准曲线将ChIRP样本浓度 (C) 确定为Input的百分比。
5. 计算Cprobe of interest 和Cnegative control probe的比例确定富集倍数。

对每个独立实验，我们建议您在可能的情况下，在一块板上按3个复孔进行如下ChIRP qPCR实验。

对于阳性对照实验，目标探针池为试剂盒所提供的TERC探针池，阴性对照RNA为人GAPDH (提供引物)，阳性对照RNA为人TERC (提供引物)，阴性对照DNA为人GAPDH编码区(提供引物)，阳性对照DNA为人WNT区(提供引物)。

ChIRP Sample	Negative Control	Positive Control
Input dilution series 1	X	X
Input dilution series 2	X	X
Input dilution series 3	X	X
Input dilution series 4	X	X
ChIRP with probe pool (even) of interest	X	X
ChIRP with probe pool (odd) of interest	X	X
ChIRP with negative control probe pool (LacZ)	X	X

b. $\Delta\Delta C_t$ 法

1. 用2 μ L ChIRP样本进行实时定量PCR (或RT-PCR)，且Input样本做3个复孔。
2. 分别用靶向阳性对照和阴性对照的引物簇进行实时定量PCR (或RT-PCR)。

3. 利用来自qPCR设备制造商的实时检测3.0系统软件计算阈值循环 (Ct) 值。
4. 对于以目标探针和阴性对照探针进行的ChIRP实验都要以input样本 (ΔCt) 对ChIRP样本Ct值进行标准化，方法为用ChIRP样本的Ct值减去Input样本的Ct值：
$$\Delta Ct = Ct_{ChIRP} - (Ct_{input} - \log_2 [\text{Input稀释因子}])$$
 (假如用10% Input样本，Input稀释因子即为10)。
5. 计算每个ChIRP样本的Input百分比：
$$\text{Input百分比} = 2^{-\Delta Ct [\text{normalized ChIRP}]}$$
。
6. 用目标探针的 ΔCt 值相对于阴性对照探针($\Delta\Delta Ct$)对ChIRP进行标准化，方法为阴性对照抗体组的 ΔCt 值减去目标抗体组的 ΔCt 值 ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{positive}} - \Delta Ct_{\text{negative}}$)。
7. 评估ChIRP样本中目标探针相对于阴性对照探针的富集倍数：
$$\text{富集倍数} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$
。

J . ChIRP-seq (NGS分析)

ChIRP-seq NGS库可以利用回收的ChIRP DNA 和合适的NGS库构建试剂盒或方法进行制备。加入ChIRP DNA 样本少于1ng，可以使用PureGenome™ Low Input NGS Library Construction Kit (Cat. # 17-10492) 或同等级别的文库构建试剂盒。

为确保有效的文库构建，ChIRP DNA 可在建库前用MiniElute® Reaction Cleanup kit (QIAGEN) 过柱纯化。ChIRP-Seq文库分析可以在ChIRP DNA和Input DNA(总DNA)，不同探针组，或不同刺激条件下的细胞裂解物等之间进行。用试剂盒中阴性对照 (LacZ) 可能无法进行分析，因为一般其回收的DNA量极低。图6显示了以lncRNA探针簇NEAT1 (Cat. #03-308) 成功进行ChIRP-seq分析的例子。

Example of Magna ChIRP Data Using TERC Probe Set

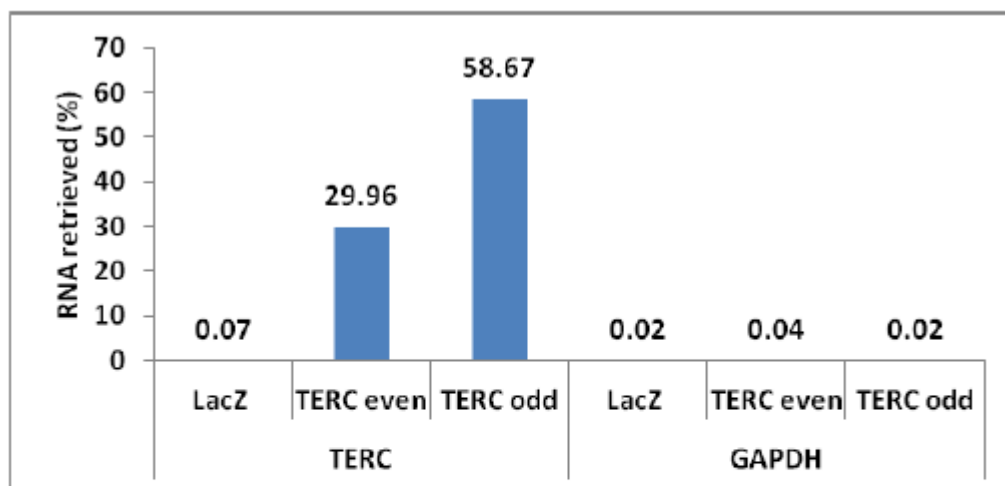


Figure 2: Successful retrieval of RNA by ChIRP with TERC probes

ChIRP was performed using HeLa cell lysate and either Magna ChIRP TERC lncRNA Probe Set even (Part # CS216575), odd (Part # CS216563) or Magna ChIRP Negative Control Probe Set (LacZ) (Part # CS216572). Purified RNA was then analyzed by qRT-PCR using RNA Positive Control Primers (TERC Gene, Positive target, Part # CS216598) and RNA Negative Control Primers (GAPDH) Part # CS216610).

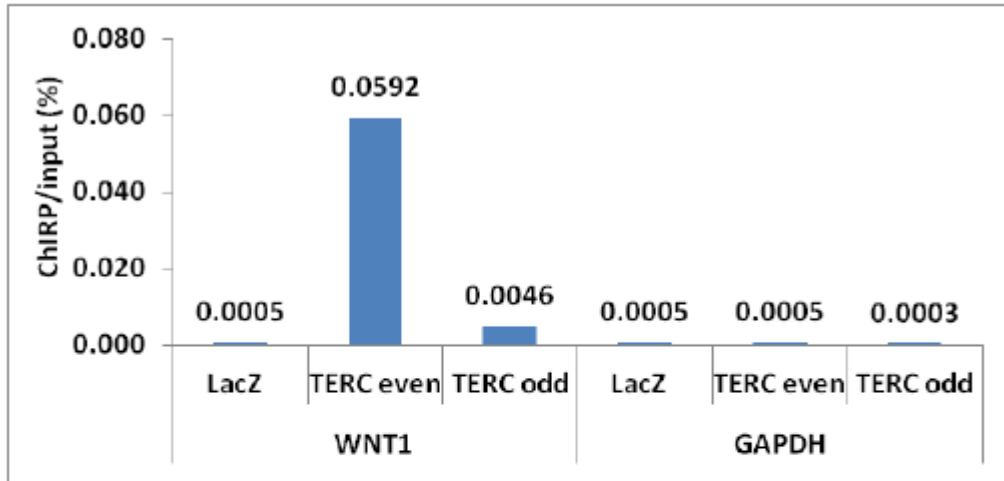


Figure 3. Successful DNA binding by ChIRP with TERC probes

ChIRP was performed using HeLa cell lysate and either Magna ChIRP™ TERC lncRNA Probe Set even (Part # CS216575), odd (Part # CS216563) or Magna ChIRP™ Negative Control Probe Set (LacZ, Part # CS216563). Purified DNA was then analyzed by qPCR using Magna ChIRP™ Primers, WNT-1 precursor (Positive target, Part # CS216609) and ChIRP Primers, GAPDH coding D2 (Negative Target, Part # CS207323).

Example of Magna ChIRP Data Using NEAT1 Probe Set

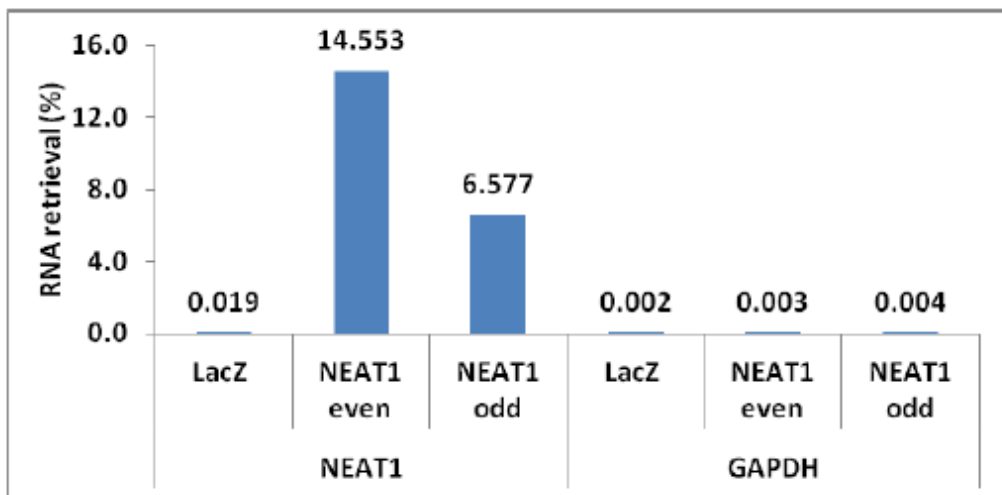


Figure 4: Successful retrieval of RNA by ChIRP with NEAT1 probes

ChIRP was performed using HeLa cell lysate and either Magna ChIRP NEAT1 lncRNA Probe Set even, odd (Cat. # 03-308) or Magna ChIRP Negative Control Probe Set (LacZ, Part # CS216572). Purified RNA was then analyzed by qRT-PCR using Primers specific for NEAT1 (Positive target) and GAPDH (Negative Target, Part # CS216610).

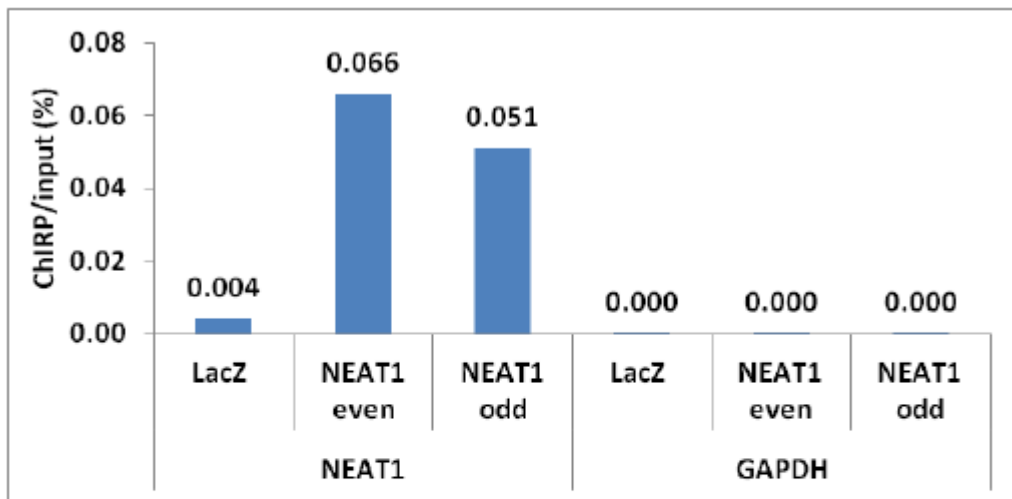


Figure 5. Successful DNA binding by ChIRP with NEAT1 probe sets

ChIRP was performed using HeLa cell lysate and either Magna ChIRP NEAT1 lncRNA Probe Set even, odd (Cat. # 03-308), or Magna ChIRP negative control probe set (LacZ, Part # CS216572). Purified DNA was then analyzed by qPCR using Primers specific for NEAT1 coding region and GAPDH coding D2 (Negative Target, Part # CS207323).

Example of Magna ChIRP-seq Data

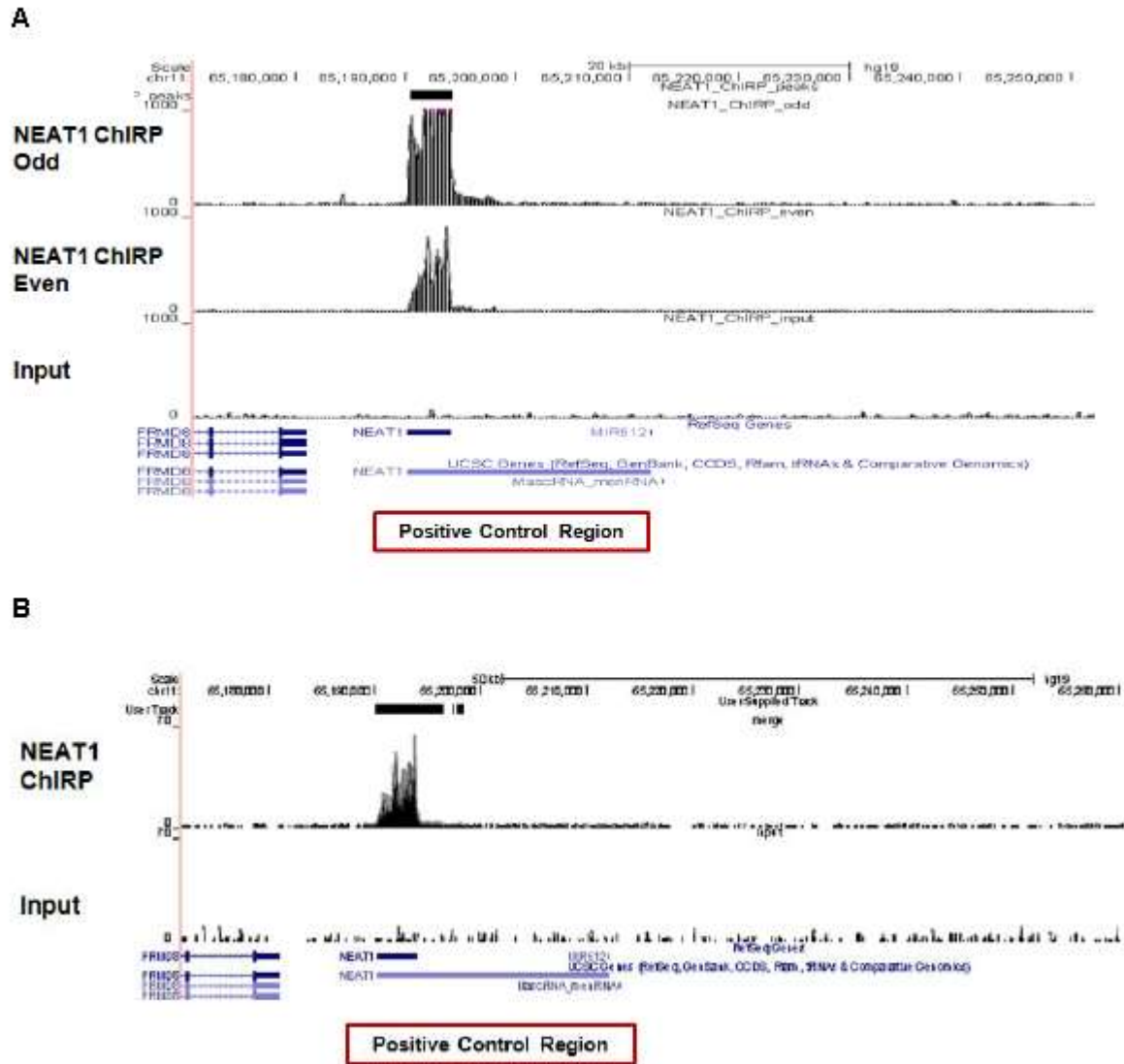


Figure 6: Successful DNA binding by ChIRP-seq with lncRNA probe sets NEAT1

ChIRP-seq was performed with lncRNA probe sets NEAT1 (Cat. # 03-308). The sequence libraries were constructed with NGS Library Construction Kit (Cat. # 17-10492) and sequenced on HiSeq instrument (Illumina). The sequence reads were aligned to the reference genome (hg19) using Bowtie. (A) Peaks were called separately using data from even and odd probe sets. Algorithms such as MACS can be used for this purpose. Those in common were considered to be valid peaks. (B) A series of post-alignment processing and filtering steps were carried out using analysis software available from the laboratory of Howard Chang (<http://changlab.stanford.edu/protocols.html>). The data showing localization of NEAT1 mRNA to the NEAT1 gene region.³

References

1. Chu C, Qu K, Zhong FL, Artandi SE, Chang HY. *Mol Cell*. 2011 Nov 18; 44(4):667-78.
2. Chu C, Quinn J, Chang HY. *J Vis Exp*. 2012 Mar 25;(61):e3912
3. Simon MD, Wang CI, Kharchenko PV, West JA, Chapman BA, Alekseyenko AA, Borowsky ML, Kuroda MI, Kingston RE. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Dec 20;108(51):20497-502