

GenSeq® ChIRP试剂盒

GS-EG-009

Instruction Manual Version 1.0

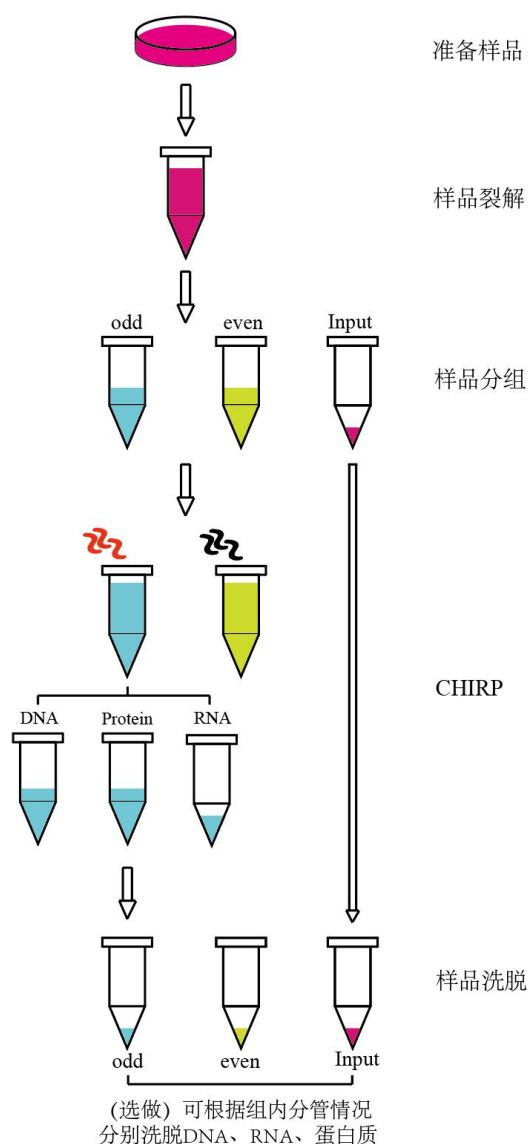
(Updated, Feb 2025)

产品简介

ChIRP (Chromatin Isolation by RNA Purification) 是一种研究 RNA 与染色质相互作用的重要技术，在基因调控、表观遗传学等领域具有关键作用。通过生物素标记的 RNA 探针，特异性地捕获与 RNA 结合的染色质复合物，进而分析其中的蛋白质或 DNA 成分，为研究 RNA 在基因表达调控中的作用提供了有力工具。

GenSeq® ChIRP 试剂盒专为 ChIRP 实验设计，包含了 ChIRP 流程中的所有核心试剂，具有出色的性价比。优化后的实验流程不仅可以高效富集低丰度的 RNA-染色质复合物，而且信噪比更高，有效减少非特异性结合的干扰。使用 GenSeq® ChIRP 试剂盒，研究人员可以轻松地从细胞核中提取高质量的 RNA-染色质复合物，为进一步的分析提供可靠的基础。ChIRP 实验得到的产物可以通过多种方法进行后续分析。例如，通过 Western Blot 可以检测特定的 RNA 结合蛋白是否与 RNA 相互作用；通过质谱实验可以鉴定与 RNA 结合的蛋白质种类；通过荧光定量 PCR 或高通量测序，可以鉴定与 RNA 相互作用的 DNA 序列，从而揭示 RNA 在基因调控中的具体作用。这些多样化的分析手段，使得 ChIRP 技术成为研究 RNA 与染色质相互作用的强大工具。

实验流程图



试剂盒组分（12 次反应*）	体积	保存条件
ChIRP Lysis Buffer	9 mL	4°C
Hybridization Buffer	6 mL	4°C
SA Beads	650 µL	4°C
5 × ChIRP Wash Buffer	13 mL	4°C
RNA PK Buffer	1 mL	4°C
DNA Elution Buffer	3.5 mL	4°C
PC Buffer	1.5 mL	4°C
Protease Inhibitor	43 µL	-20 °C
RNase Inhibitor	10 µL	-20 °C
Proteinase K	233 µL	-20 °C
RNase A	37 µL	-20 °C
PC Enhancer	37 µL	-20 °C
2×SDS-PAGE Loading Buffer	400 µL	-20 °C

*:此规格试剂盒可用于 6 次奇数探针 ChIRP 实验+ 6 次偶数探针 ChIRP 实验。

试剂盒组分 (24次反应*)	体积	保存条件
ChIRP Lysis Buffer	18 mL	4°C
Hybridization Buffer	12 mL	4°C
SA Beads	1.3 mL	4°C
5 × ChIRP Wash Buffer	25 mL	4°C
RNA PK Buffer	2 mL	4°C
DNA Elution Buffer	7 mL	4°C
PC Buffer	3 mL	4°C
Protease Inhibitor	85 µL	-20 °C
RNase Inhibitor	19 µL	-20 °C
Proteinase K	465 µL	-20 °C
RNase A	74 µL	-20 °C
PC Enhancer	74 µL	-20 °C
2×SDS-PAGE Loading Buffer	800 µL	-20 °C

*:此规格试剂盒可用于 12 次奇数探针 ChIRP 实验+ 12 次偶数探针 ChIRP 实验。

自备材料

=====

- ✓ 磁力架（适配1.5 mL EP 管）
- ✓ 移液器及吸头（无核酸酶）
- ✓ 无核酸酶管（1.5 mL EP 管）
- ✓ 4°C 离心机
- ✓ 涡旋混匀仪
- ✓ 无核酸酶水
- ✓ PBS 缓冲液
- ✓ 37%甲醛溶液
- ✓ 1.375 M甘氨酸
- ✓ Trizol
- ✓ 氯仿
- ✓ 苯酚：氯仿：异戊醇，25:24:1

实验步骤

1. 样品预处理

✧配置 Complete Lysis Buffer

根据反应数，按下表配置合适体积的 Complete Lysis Buffer*，混匀后冰上放置备用。

	× 1	× N
ChIRP Lysis Buffer	500 μ L	500 μ L × N
Protease Inhibitor	2.5 μ L	2.5 μ L × N
RNase Inhibitor	0.5 μ L	0.5 μ L × N

*：一般而言，每个反应约需 500 μ L Complete Lysis Buffer。

✧悬浮细胞：

- 1) 取约 4×10^7 细胞在 4°C ，1,000g 离心 5 min，收集细胞沉淀，吸弃上清；
- 2) 用 1 mL 冰上预冷的 1 × PBS 重悬细胞沉淀， 4°C ，1,000g 离心 5 min，小心吸弃上清；
- 3) 重复步骤 2) 一次；
- 4) 用 5 mL 包含 1% 甲醛的 PBS 溶液重悬细胞，轻轻吹散细胞，放置在旋转混匀仪上室温孵育 10 min；
- 5) 加入 0.5 mL 1.375 M 甘氨酸，放置在旋转混匀仪上室温孵育 5 min；
- 6) 4°C ，2,000g 离心 5 min，吸弃上清；
- 7) 用 10 mL 冰上预冷的 1 × PBS 重悬细胞沉淀， 4°C ，1,000g 离心 5 min，小心吸弃上清；
- 8) 用 1 mL 冰上预冷的 1 × PBS 重悬细胞沉淀，转移至 1.5 mL EP 管， 4°C ，1,000g 离心 5 min，小心吸弃上清；
- 9) 用 0.5 mL 的 Complete Lysis Buffer 重悬细胞，轻轻吹散细胞；
- 10) 冰上静置 10 min。

✧贴壁细胞：

- 1) 用 10 mL 冰上预冷的 1 × PBS 清洗培养皿或培养瓶中的细胞两次；
- 2) 加入 10 mL 预冷 PBS 后用细胞刮将细胞刮下来，收集至 EP 管中；
- 3) 4°C 1,000g 离心 5 min，小心吸弃上清，收集细胞沉淀；
- 4) 用 5 mL 包含 1% 甲醛的 PBS 溶液重悬细胞，轻轻吹散细胞，放置在旋转混匀仪上室温孵育 10 min；
- 5) 加入 0.5 mL 1.375 M 甘氨酸，放置在旋转混匀仪上室温孵育 5 min；
- 6) 4°C ，2,000g 离心 5 min，吸弃上清；
- 7) 用 10 mL 冰上预冷的 1 × PBS 重悬细胞沉淀， 4°C ，1,000g 离心 5 min，小心吸弃上清；

- 8) 用 1 mL 冰上预冷的 1 × PBS 重悬细胞沉淀，转移至 1.5 mL EP 管，4℃，1,000g 离心 5 min，小心吸弃上清；
- 9) 用 0.5 mL 的 Complete Lysis Buffer 重悬细胞，轻轻吹散细胞；
- 10) 冰上静置 10 min。

◇组织样本

- 1) 0.4 g 新鲜组织样本剪碎至 1 mm³ 体积*；
*：0.4 g 冻存组织液氮研磨至均匀粗粉。
- 2) 用 5 mL 包含 1% 甲醛的 PBS 溶液重悬组织，轻轻吹散组织，放置在旋转混匀仪上室温孵育 10 min；
- 3) 加入 0.5 mL 1.375 M 甘氨酸，放置在旋转混匀仪上室温孵育 5 min；
- 4) 4℃，2,000g 离心 5 min，吸弃上清；
- 5) 用 10 mL 冰上预冷的 1 × PBS 重悬组织，4℃，1,000g 离心 5 min，小心吸弃上清；
- 6) 重复步骤 5) 一次；
- 7) 将清洗后的组织转移至适量预冷的 1 × PBS 中，用匀浆器或其他细胞分离设备使组织分散为单个细胞；
- 8) 4℃，2,000g 离心 5 min，吸弃上清；
- 9) 用 0.5 mL 的 Complete Lysis Buffer 重悬细胞，轻轻吹散细胞；
- 10) 冰上静置 10 min。

2. 超声破碎

- 11) 4℃，超声破碎步骤 10) 中裂解产物：on 15 s，off 45 s，65% 功率 超声 10-20 min 至样品澄清；
- 12) 取 10 μL 超声后样品，2% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 片段大小，片段大小要求为 100-500 bp 范围内；
- 13) 4℃，16,000g 离心 10 min，可取 100 μL 超声后产物作为 input 组放入 -80℃ 保存备用，剩下超声后产物一分为二进行后续实验，一份用于奇数探针 ChIRP 实验，一份用于偶数探针 ChIRP 实验。

3. 探针-样品孵育

- 14) 根据样品数配置 Complete Hybridization Buffer*，混匀后冰上放置备用；

	× 1	× N
Hybridization Buffer	400 μL	400 μL × N
Protease Inhibitor	2 μL	2 μL × N
RNase Inhibitor	0.4 μL	0.4 μL × N

*：一般而言，每个反应约需 400 μL Complete Hybridization Buffer。

- 15) 将探针稀释 10 μM*，取 6 μL 放入预热至 85℃ 的 PCR 仪孵育 3 min，立即放置在冰上；

*：奇数探针ChIRP实验为一个反应，偶数探针ChIRP实验为一个反应，奇数探针和偶数探针不可混为一管进行反应。

16) 在步骤13) 样品中分别加入400 μ L Complete Hybridization Buffer、6 μ L探针，移液枪轻柔吹打混匀；

17) 37°C 孵育2 h。

4. 磁珠准备

18) 用移液枪轻柔吹打SA Beads使之充分重悬；

19) 按反应数准备新的1.5 mL EP 管，分别取50 μ L SA Beads到 EP 管中；

20) 将 EP 管放置在磁力架上待溶液澄清（约2 min）；

21) 吸弃上清，勿搅动磁珠，从磁力架上取下 EP 管；

22) 用 ChIPR Lysis Buffer 洗涤SA Beads：

a. 从磁力架取下 EP 管后加入200 μ L ChIPR Lysis Buffer，用移液枪轻柔吹打混匀；

b. 将 EP 管放置在磁力架上待溶液澄清（约2 min）；

c. 吸弃上清，勿搅动磁珠。

23) 重复步骤 22)，再次洗涤。

5. ChIRP

24) 将步骤17) 中探针-样品复合物加入到准备好的磁珠中，移液枪轻柔吹打混匀；

25) 37°C 旋转孵育1 h*；

*孵育时间若过度延长，会增加产物的非特异性，影响实验结果准确性。

26) 短暂离心，将 EP 管置于磁力架上待溶液澄清（约2 min）；

27) 吸弃上清，勿搅动磁珠；

28) 用 37°C预热的 1 $\times$ ChIPR Wash Buffer洗涤 SA Beads：

a. 从磁力架取下 EP 管后加入 1 mL 37°C预热的 1 $\times$ ChIPR Wash Buffer，用移液枪轻柔吹打混匀，37°C孵育5 min；

b. 将 EP 管放置在磁力架上待溶液澄清（约 2 min）；

c. 吸弃上清，勿搅动磁珠。

29) 重复步骤 28) 三次（即：用 37°C预热的 1 $\times$ ChIPR Wash Buffer清洗磁珠共计 4次）；

30) 每管中加入900 μ L 37°C预热的 1 $\times$ ChIPR Wash Buffer，用移液枪轻柔吹打混匀磁珠，取100 μ L 标记为ChIRP RNA，剩余样品平均分配2管，分别标记为ChIRP DNA，ChIRP Protein。

6. （选做）蛋白洗脱

31) 后续实验为质谱：

a. 将 EP 管放置在磁力架上待溶液澄清（约2 min）；

b. 吸弃上清，勿搅动磁珠。

- c. 加入 200 μ L冰上预冷的1 $\times$ PBS 到磁珠中，移液枪轻柔吹打混匀；
- d. 将 EP 管置于磁力架上待溶液澄清（约2 min）；
- e. 吸弃上清，勿扰动磁珠；
- f. -80 $^{\circ}$ C保存磁珠用于后续实验。

32) 后续实验为银染或WB:

- a. 将EP管放置在磁力架上待溶液澄清（约2 min）；
- b. 吸弃上清，勿搅动磁珠。
- c. 加入30 μ L 2 $\times$ SDS-PAGE Loading Buffer到磁珠中，移液枪轻柔吹打混匀；
- d. 95 $^{\circ}$ C 孵育 5-10 min；
- e. 将 EP 管置于磁力架上待溶液澄清（约2 min）；
- f. 吸取上清至新的 EP 管中，勿扰动磁珠；
- g. -80 $^{\circ}$ C保存上清用于后续实验。

7. （选做）RNA纯化

- 31) 取ChIRP RNA样品，将EP管放置在磁力架上待溶液澄清（约2 min）*；
*: “input”不进行此实验步骤。
- 32) 吸弃上清，勿搅动磁珠*；
*: “input”不进行此实验步骤。
- 33) ChIPR 磁珠加入47.5 μ L RNA PK Buffer，吸打混匀； input 组取10 μ L并标记为Input RNA，加入37.5 μ L RNA PK Buffer；
- 34) 分别加入2.5 μ L Proteinase K，50 $^{\circ}$ C震荡孵育1 h；
- 35) 孵育结束后立即放在冰上冷却2 min，加入500 μ L的Trizol到步骤34) 样品中，涡旋混匀，室温静置5 min；
- 36) 加入100 μ L的氯仿，涡旋混匀；
- 37) 4 $^{\circ}$ C，12,000g离心15 min；
- 38) 取上层水相（约270 μ L）到新的EP 管中，依次加入30 μ L PC Buffer, 1 μ L PC Enhancer，750 μ L冰上预冷的无水乙醇，涡旋混匀，-80 $^{\circ}$ C沉淀3 h或过夜；
- 39) 将沉淀产物 4 $^{\circ}$ C，15,000g 离心 25 min；
- 40) 用移液枪吸弃上清，务必注意不要触碰到RNA沉淀；
- 41) 加入1 mL用无核酸酶水配置的 75% 乙醇，4 $^{\circ}$ C，15,000g 离心 15 min；
- 42) 用移液枪吸弃上清，务必注意不要触碰到 RNA 沉淀；
- 43) 室温开盖干燥 2-5 min；
- 44) 加入10 μ L无核酸酶水充分溶解 RNA 沉淀，取1 μ L用于定量，剩余 RNA 立即进行后续实验或-80 $^{\circ}$ C暂存。

8. (选做) DNA纯化

- 31) 取ChIRP DNA样品, 将 EP 管放置在磁力架上待溶液澄清 (约2 min) *;
*: “input”不进行此实验步骤。
- 32) 吸弃上清, 勿搅动磁珠*;
*: “input”不进行此实验步骤。
- 33) 依次加入100 μ L DNA Elution Buffer、1 μ L RNase A 重悬磁珠, 吸打混匀后37°C振荡孵育30 min;
- 34) 将EP管放置在磁力架上待溶液澄清 (约2 min), 转移上清至新的1.5 mL离心管中;
- 35) 重复步骤 33) -34) 一次;
- 36) 收集并混合两次上清洗脱液;
- 37) input 组取45 μ L并标记为Input DNA, 加入153 μ L DNA Elution Buffer、2 μ L RNase A, 37°C振荡孵育1 h;
- 38) 每个样品加入10 μ L Proteinase K, 涡旋混匀;
- 39) 55°C旋转孵育1 h;
- 40) 加入300 μ L 的苯酚: 氯仿: 异戊醇=25:24:1*, 涡旋混匀15 s后静置10 min;
*苯酚为Tris饱和酚
- 41) 4°C, 16,000g离心5 min;
- 42) 取上层水相 (约270 μ L) 到新的EP 管中, 依次加入30 μ L PC Buffer, 1 μ L PC Enhancer, 750 μ L冰上预冷的无水乙醇, 涡旋混匀, -80°C沉淀3 h或过夜;
- 43) 将沉淀产物4 °C, 15,000g离心 25 min;
- 44) 用移液枪吸弃上清, 务必注意不要触碰到RNA沉淀;
- 45) 加入1 mL用无核酸酶水配置的 75% 乙醇, 4 °C, 15,000g离心 15 min;
- 46) 用移液枪吸弃上清, 务必注意不要触碰到 RNA 沉淀;
- 47) 室温开盖干燥 2-5 min;
- 48) 加入10 μ L无核酸酶水充分溶解DNA沉淀, 放置于冰上备用。

FAQ

.....

1. 为什么非特异性背景高？

Re: 可能是洗涤不彻底或探针/抗体非特异性结合，导致高背景噪声，可通过以下方法解决：

- 1) 设置阴性对照（如无关RNA探针或IgG抗体对照），排除非特异性结合；
- 2) 在ChIRP前，用Protein A/G磁珠预清除样本中的非特异性结合蛋白。

2. 为什么信号弱或无信号？

Re: 探针效率低、用量不足或DNA片段化不当，可通过以下方法解决：

- 1) 增加探针终浓度；
- 2) 优化染色质片段化条件，确保DNA片段大小在100-500 bp范围内，避免过小片段丢失。

相关产品:

试剂盒	货号	规格
GenSeq® m6A MeRIP Kit	GS-ET-001	12T、24T、48T
GenSeq® m1A MeRIP Kit	GS-ET-002	12T、24T、48T
GenSeq® m5C MeRIP Kit	GS-ET-003	12T、24T、48T
GenSeq® m7G MeRIP Kit	GS-ET-004	12T、24T、48T
GenSeq® ac4C IP Kit	GS-ET-005	12T、24T、48T
GenSeq® RIP Kit	GS-ET-006	12T、24T、48T
GenSeq® O8G IP Kit	GS-ET-007	12T、24T、48T
GenSeq® Ψ IP Kit	GS-ET-008	12T、24T、48T
GenSeq Hi-C Kit	GS-EG-003	6T
GenSeq® Co-Immunoprecipitation (CoIP) Kit	GS-EG-008	6T、12T、24T
GenSeq® CHIRP Kit	GS-EG-009	6T、12T、24T
GenSeq® RNA Pull Down Kit	GS-EG-010	6T、12T、24T
GenSeq® RCA DNA Amplification Kit	GS-MB-002	25T、100T

上海云序生物科技有限公司

服务电话：021-64878766

网址：<http://www.cloud-seq.com.cn>

地址：上海市松江区漕河泾莘砖公路518号24号楼4楼

