天净沙系列

CAT#:240725-8

低温运输，-80℃保存

天净沙

CLIP-qPCR 检测试剂盒

Skygen CLIP-qPCR Kit

使用手册 V0.8

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

Clip（Crosslinking-Immunprecipitation）染色质免疫沉淀，是一种基于 RNA 与其相应的 RNA 结合蛋白会在紫外照射下会发生共价结合，研究蛋白质和 RNA 相互作用的重要技术。CLIP-qPCR（紫外交联免疫沉淀结合 qPCR 定量技术）则是在此基础上，通过免疫共沉淀富集 RNA 结合蛋白（RBP）及其所结合的 RNA 复合物，随后依次经蛋白酶 K、DNase I 和 RNase T1 消化处理，获得纯化后的 RNA。该 RNA 经 3'端接头连接后，可针对不同目标位点设计特异性引物，进而通过 qPCR 定量检测各结合位点的富集效率。

规格及成分

Part1 使用大扁盒包装

成分	编号	规格	包装
25× PBS 溶液	240725-8a	25 mL	30 mL 本色瓶
细胞裂解液	240725-8b	165 mL	250 mL 本色瓶
磁珠	240725-8c	0.8 mL	1 mL 本色瓶
洗涤液	240725-8d	89 mL	150 mL 本色瓶
2×蛋白酶 K 缓冲液	240725-8e	2.0 mL	2.0 mL 本色瓶
使用手册	240725-8sc	1 份	无

Part2 使用大扁盒包装

成分	编号	规格	包装
100× DTT 溶液	240725-8f	1.2 mL	1.5 mL 本色瓶
100×蛋白酶抑制剂	240725-8I	1.2 mL	1.5 mL 本色瓶
IgG 抗体（1 μg/μL）	240725-8g	100 μL	1.0 mL 本色瓶
RNase T1	240725-8h	120 μL	1.0 mL 本色瓶
DNase I	240725-8j	0.4 mL	1.0 mL 本色瓶
蛋白酶 K	240725-8k	0.4 mL	1.0 mL 本色瓶
2× miRNA Mix	240725-8m	400 μL	1.0 mL 本色瓶
酶混合液	240725-8n	80 μL	1.0 mL 本色瓶
10 μM PCR 下游引物	Yw240725-8	1.2 mL	1.5 mL 本色瓶

注：PBS（25×）使用时需稀释到 1×。DTT 与蛋白酶抑制剂需现用现加；

运输及保存

低温运输，part1 部分 4℃保存；part2 部分-20℃保存。有效期 1 年。

自备试剂

ddH2O、4-硫尿核苷、Trizol 试剂、氯仿、异丙醇、乙醇等

使用方法	**以上 4℃试剂若有白色絮状物析出为正常现象，使用前 37℃预热至澄清即可。** **一、引物设计** 1. 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 下游引物（10 μM），用于 qRT-PCR 实验。 **二、样本处理和交联：样本处理建议及时开展，实验过程使用无 RNase DNase 的离心管和枪头** 2. 细胞培养：在 6 个 15 cm 培养皿中扩大培养细胞，培养至密度为 80%的聚合度；在交联前 16 h 向细胞培养液中加入 4-硫尿核苷（4-Thiouridine）至终浓度 100 μM。 3. 紫外交联（贴壁细胞）： ⑴ 将培养皿中的细胞用 5 mL/板预冷的 1× PBS（将 25× PBS 稀释至 1×）洗 1 次，吸掉 PBS； ⑵ 将细胞放在有冰的托盘上，置于 365 nm 紫外灯下进行照射，照射的剂量设为 0.15 J/cm2，交联时间 10 min； ⑶ 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℃、500 g 离心 5 min，去除上清； ⑷ 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℃，冻存的细胞沉淀可以保存至少 12 个月。 4. 紫外交联（悬浮细胞） ⑴ 将细胞放在有冰的托盘上，置于 365 nm 紫外灯下进行照射，照射的剂量设为 0.15 J/cm2，交联时间 10 min； ⑵ 将悬浮细胞转移到 50 mL 无酶离心管中，4℃、500 g 离心 5 min，去除上清； ⑶ 向细胞沉淀加 5 mL 1× PBS，重悬，4℃、500 g 离心 5 min，去除上清； ⑷ 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。 5. 紫外交联（动物组织） ⑴ 收集组织（0.6~0.9 g），将组织放入装有 5 mL 预冷的 1× PBS 的

培养皿，轻轻摇动清洗组织后去除 PBS；

⑵ 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；

⑶ 将组织转移至培养皿中，置于有冰的托盘上，在 254 nm 紫外灯下进行照射，照射的剂量设为 0.15 J/cm2，交联时间 10 min；

⑷ 将组织用 5 mL 预冷的 1× PBS 转移到 50 mL 无酶离心管中，4℃、500 g 离心 5 min 收集细胞沉淀并去除上层清液；

⑸ 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。

三、细胞裂解与 RNaseT1 消化

6. 在交联的细胞中加入 12 mL 1×细胞裂解液，加入 120 μL 100× DTT 溶液和 120 μL 100×蛋白酶抑制剂，并且在冰上裂解 10 min，期间涡旋混匀 2~3 次；
7. 将细胞裂解液在 4℃、13000 g 离心 15 min，弃沉淀；
8. 上清中加入 12 μL RNase T1（终浓度 1 U/μL），22℃水浴 15 min 后，立即冰浴 5 min；
9. 上清取 200 μL 作为样本对照组，置于-80℃保存，6 mL 作为实验组，6 mL 作为阴性对照组；

四、磁珠孵育

10. 实验组加入 5~10 μg 特异性目的抗体，阴性对照组加入 5~10 μL IgG 抗体，在垂直混匀器上 4℃、15 r/min，过夜孵育。
11. 实验组和阴性对照组磁珠准备：各取 40 μL 磁珠到 1.5 mL EP 管中，各加入 1 mL 1×细胞裂解液，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；
12. 实验组和阴性对照组磁珠分别加入 40 μL 1×细胞裂解液重悬；
13. 将磁珠加入到相应的实验组和阴性对照组中，4℃旋转孵育 3 h；
14. 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×洗涤液，颠倒混匀 10 次后，将磁珠转移到 1.5 mL EP 管中，置于磁力架，吸附 20~30 s，倒弃上清；
15. 重复上一步骤洗涤 2 次。

注意事项：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。

五、DNase I 消化

16. 将 EP 管置于磁力架上，吸附磁珠 20~30 s，倒弃上清，实验组和阴性对照组各加入 100 μL 1×洗涤液和 20 μL DNase I；
17. 37℃水浴 15 min 后，立即冰浴 5 min；
18. 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×洗涤液，洗涤磁珠 3 次后，在磁力架上吸附，去上清；
19. 实验组和阴性对照组各加入 100 μL 1×细胞裂解液。

    注意：水浴消化期间，每隔 5 min 轻弹离心管底部使磁珠悬浮；水浴可用杂交炉旋转消化代替。

六、蛋白消化与 RNA 提取

20. 取样本对照组，加入 10 μL 蛋白酶 K；取实验组和阴性对照组，均加入等体积（100 μL） 2×蛋白酶 K 缓冲液与 10 μL 蛋白酶 K；
21. 55℃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；
22. 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；
23. 4℃、12 000 g 离心 10 min；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；
24. 4℃、12 000 g 离心 10 min；弃上清，加入 1 mL 75%乙醇（无酶水配制），洗涤沉淀 1 次；
25. 4℃、12 000 g 离心 10 min；小心弃上清，室温晾干 10 min，将乙醇全部挥发；
26. 加入 20 μL ddH2O（RNase DNase free），溶解 RNA，-80℃保存备用。

    注意：水浴消化期间，每隔 5 min 轻弹离心管底部使磁珠悬浮

七、3’-端加接头及逆转录

27. 在PCR管中配制加接头体系：10 μL 2×miRNA Mix、2 μL酶混合液、1 μL 模板 RNA，加 ddH2O（RNase DNase free）补至 20 μL；
28. 反应程序：37℃ 1 h、85℃ 5 min。

八、qPCR

29. 反应体系配制：10 μL 2×SYBR Mater Mix、1 μL PCR 上下游引物

	（10 μM）、2 μL cDNA 模板、加 ddH2O 补至 20 μL； 30. 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； 31. 结果分析：△Ct 公式为：△Ct=实验组 Ct-（样本对照组 Ct-4.9），2^（-△Ct）=富集效率%（样本对照组）；△△Ct 公式为：△△Ct=（实验组ΔCt-样本对照组ΔCt），2^（-△△Ct）=得到富集倍数。 注：根据细胞裂解液体积比，样本对照组:实验组:阴性对照组=1:30:30 得到 DF 为 log2(30)=4.9 cycles。
关联产品	天净沙 ChIP 染色质免疫沉淀试剂盒