ICS 35.240.80
C 07

团　体　标　准

T/CHIA 42.1-2023

长非编码 RNA 和蛋白相互作用注释标准
第 1 部分：RIP-seq 和 CLIP-seq 的实验方法流程

Specifications for interaction between long non-coding RNA and proteins

Part 1：Experiment pipeline of RIP-seq and CLIP-seq

2023-11-14 发布　　2024-02-01 实施

中国卫生信息与健康医疗大数据学会　发布

目　次

前　言 I
引　言 II
1 范围 1
2 规范性引用文件 1
3 术语和缩略语 1
4 RIP-seq 实验流程 2
5 CLIP-seq 实验流程 2

前　　言

本标准按照GB/T 1.1—2020给出的规则起草。

T/CHIA 42-2023《长非编码RNA和蛋白相互作用注释标准》分为以下3个部分：

——第1部分：RIP-seq和CLIP-seq的实验方法流程

——第2部分：RIP-seq和CLIP-seq的数据分析方法

——第3部分：长非编码RNA及其相互作用蛋白质的功能注释

本标准为T/CHIA 42-2023的第1部分。

本标准由中国科学院生物物理研究所提出，由中国卫生信息与健康大数据学会归口。

本标准主要起草单位：中国科学院生物物理研究所、中国科学院北京基因组研究所（国家生物信息中心）、浙江大学、复旦大学、清华大学、中国人民解放军总医院、北京蛋白质组研究中心、中国科学院微生物研究所、北京大学人民医院、中国科学院上海营养与健康研究所、中南大学、空军军医大学（第四军医大学）、中国科学院计算技术研究所和北京睿博解码生物科技有限公司。

本标准主要起草人：陈润生、何顺民、宋廷瑞、张鹏、周红红、王晓娜、方向东、金力、何昆仑、李亦学、张学工、段会龙、周水庚、渠鸿竹、赵思琪、钱颖、王霞、赵屹、吕旭东、朱云平、马俊才、杨忠、石乐明、吴松峰、吴林寰、王振、陈先来、贾志龙、张昭军、娄晓敏、阮修艳、单广乐、乔楠、刘登辉、丁子建。

引　　言

《长非编码 RNA 和蛋白相互作用注释标准 第 1 部分：RIP-seq 和 CLIP-seq 的实验方法流程》旨在规范现有长非编码 RNA 和蛋白质相互作用实验技术的检测条件，为长非编码 RNA 和蛋白质相互作用的检测实验流程提供一套术语规范、定义明确、语义语境无歧义的标准。

长非编码 RNA 和蛋白相互作用注释标准

第 1 部分：RIP-seq 和 CLIP-seq 的实验方法流程

1 范围

本标准规定了 RIP-seq 和 CLIP-seq 的实验方法流程规范。

本标准适用于指导实验人员进行 RIP-seq 和 CLIP-seq 等捕获长非编码 RNA 与蛋白质相互作用的样品制备作业。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本标准必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本标准；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

GB/T 29859-2013 生物信息学术语

GB/T 30989-2013 高通量基因测序技术规程

GB/T 35890-2018 高通量测序数据序列格式规范

3 术语和定义

GB/T 29859-2013 中界定的以及下列术语和定义适用于本标准。

3.1

长非编码 RNA 和蛋白相互作用（Long non-coding RNA and protein interactions）

指的是在细胞内，长非编码RNA分子与蛋白质分子之间发生的互相影响和联系。这种相互作用可以在细胞内的多种生物学过程中发挥重要作用，包括基因表达调控、细胞信号传导、染色质结构维护等。

3.2

RNA 免疫沉淀（RNA Immunoprecipitation）

利用免疫沉淀获取 RNA 与蛋白质相互作用的方法

3.3

交联免疫沉淀（Cross-linking immunoprecipitation）

利用交联后免疫沉淀的方法捕获 RNA 与蛋白质相互作用的方法

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

RIP-seq: RNA 免疫沉淀后进行测序的技术（RNA Immunoprecipitation and high-throughput sequencing）

CLIP-seq：紫外交联免疫沉淀结合高通量测序（cross-linking immunoprecipitation and high-throughput sequencing）

5 RIP-seq 实验流程

本文件的高通量基因测序方法涉及如下步骤:

1) 使用刮铲收集 1×10^7 细胞至 EP 管中，冷的 DEPC-PBS 洗细胞 3 次。

2) 加入 1ml 细胞裂解液，充分吹打混匀，冰上裂解细胞 30 分钟（每 10 分钟震荡混匀一次）。

3) 4℃，2000 g 离心 20 分钟。

4) 使用细胞裂解液洗涤偶联 protein A/G 的磁珠。

5) 吸出第三步中的上清液，加入 30ul 磁珠，4℃旋转混匀 1 小时，做预清除。

6) 溶液放置于磁力架上，静置 2 分钟，将上清转移至新的 EP 管，弃磁珠。

7) 将第 5 步中的上清中加入 1~5 ug 对照 IgG 或目标蛋白的抗体，4℃旋转混匀过夜。

8) 加入 30ul 磁珠，4℃旋转混匀 3 小时。

9) 用细胞裂解液洗第 7 步中的磁珠，每次 5 分钟，共 5 次。

10) 上步骤中的磁珠平均分成两份，一份加入 SDS-PAGE 上样缓冲液，沸水浴 5 分钟，用于 western 检测；一份加入 TRIzol，提取总 RNA 并使用 qRT-PCR 检测目标 RNA 含量。

6 CLIP-seq 实验流程

本文件的高通量基因测序方法涉及如下步骤。

6.1 irCLIP 蛋白纯化和连接

1) 在六孔板中生长至约 80%汇合的粘附 HeLa 细胞用冰冷的 PBS 快速冲洗，在板上吸出并在冰上用 0.25 nM UV-C 以 0.3 J/cm2 交联。然后将细胞与冰冷的 PBS/10mM EDTA 一起温育 5 分钟，通过细胞刮铲收集，并计数。

2) 将沉淀的细胞在 0.2 mL SDS 裂解缓冲液（1% SDS; 50 mM Tris, pH7.5; 1mM EDTA）中裂解，并使用超声波破碎仪进行超声处理（60 秒的六个循环，45 秒休息）。

3) 以最大速度离心 15 分钟澄清裂解物，并将可溶部分转移至新管中。将两倍体积的 IP 稀释缓冲液（1.1% Triton X-100; 50 mM Tris，pH 7.5; 1 mM EDTA; 450 mM NaCl）加入到澄清的 SDS 裂解物中，然后使用 Pierce BCA 蛋白质测定试剂盒分两份进行定量。

4) 将裂解物在 4℃下旋转 1.5 小时，同时将抗体与 proteinA/G 磁珠预结合。

5) 将免疫沉淀物依次在 4℃下用 1mL high-stringency 缓冲液（20mM Tris，pH 7.5; 120 mM NaCl; 25mM KCl; 5 mM EDTA; 1% Trition-X100; 1%脱氧胆酸钠）洗涤 10 分钟。1 mL 高盐缓冲液（20 mM Tris，pH 7.5; 1 M NaCl; 5 mM EDTA; 1% Trition-X100; 1% Na-脱氧胆酸盐; 0.001% SDS）洗涤 10 分钟。1 mL 低盐缓冲液（20mM Tris，pH 7.5; 5mM EDTA）洗涤 10 分钟。

6) 在珠上核酸酶消化之前，在磁力架上用 0.25 mL 然后用 0.1 mL NT2 缓冲液（50 mM Tris，pH 7.5; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl 2; 0.0005% Igepal）漂洗磁珠两次。

7) 将 RNaseA 和 RNaseI 在 NT2 缓冲液中稀释。使用 RNaseA，终浓度为 20～1.6ng/mL。RNase I，终浓度为 0.4 至 0.0625 u/ul。使用提供的 10 x 缓冲液，300 mM NaAcetate pH 4.6，2800 mM NaCl 和 10 mM ZnSO4 稀释 S1 核酸酶，并使用终浓度范围为 12~1 u/ul。所有核酸酶反应均为 30ul 的总体积，并补充 6ul 的 PEG400（最终的 16.7%）。在重新悬浮免疫沉淀物之前，将反应物在冰上冷却。

8) 将所有核酸酶反应在恒温混匀仪中于 30℃温育 15 分钟，15 秒 1,400 转/分钟，90 秒静息。

9) 加入 0.5mL 冰的 high-stringency 缓冲液终止核酸酶消化。然后用 0.25 mL 然后用 0.05 mL 冰冷的 NT2 缓冲液快速冲洗免疫沉淀物。

10) 将 RNase A 和 RNase I 消化的复合物用 T4 PNK 在恒温混匀仪中在 37℃，15s，1,400 rpm，30 ul 反应中（50 mM Tris，pH 7.0；10 mM MgCl 2；5 mM DTT）静置 90 秒去磷酸化 30 分钟。其含有 10 单位的 T4 PNK 和 0.1ul 的 SUPERase-IN 并含有 6ul 的 PEG400。

11) 在恒温混匀仪中进行 3'末端连接，将免疫沉淀物与 T4 RNA 连接酶 I 过夜，16℃，15 秒 1,400 rpm，90 秒静止时。30ul 反应含有 10 单位 T4 RNA 连接酶 I，1 pmole 的 preA-DNA adapter 和 0.1 ul SUPERase-IN，补充有 6ul 的 PEG400（最终 16.7%）。

12) 第二天，将珠子置于磁力架上，除去连接反应，并将磁珠重悬于 10ul 的样品缓冲液+还原剂中，并在 75℃下加热 15 分钟。

13) 将样品储存在-20℃或使用 NuPAGE 4~12% Bis-Tris 凝胶（1.0 mm×12 孔）在 180V 下通过 SDS-PAGE 立即电泳 45 分钟。将解析的 RNP 复合物在 4℃，400mA，60 分钟，湿转移至硝酸纤维素膜。

6.2 蛋白酶 K 处理并回收 RNA-蛋白结合片段

1) 转膜后不允许硝化纤维素膜干燥。准备硅化管用于所有文库步骤。将膜置于预湿润的玻璃纤维滤纸上，并用手术刀切除靶区域。

2) 将膜切成 0.5~1 mm 窄条，以便容易停留在硅化的 1.5mL 离心管的底部。

3) 向每个管中加入 0.2mL 含有 10ul 蛋白酶 K 的蛋白酶 K 反应缓冲液（100 mM Tris，pH 7.5；50mM NaCl；1mM EDTA；0.2％SDS）并在恒温混匀仪中孵育。50℃，60 分钟，1,000 rpm，15 秒转动，30 秒静止。

4) 从热混合器中取出试管并短暂离心。将 1 微升蛋白酶 K 反应物点印迹在硝酸纤维素上，并在红外成像仪上扫描，以确认预期大小的 RNA-adapter-连接蛋白的完全释放。

5) 向每个管中加入 200ul 饱和苯酚氯仿，pH 6.7，并在恒温混匀仪中温育 10 分钟，37℃，1400 转/分钟。

6) 将管短暂离心并将全部内容物转移至 2mL 重相锁凝胶管。高于 13,000 rpm 离心 2 分钟。

7) 将水层用 1mL 氯仿（倒置管 10 次以混合；不涡旋、移液或摇动）在相同的 2mL 重相锁凝胶管中再次提取。高于 13,000 rpm 离心 2 分钟。

8) 将水层转移到新的 2mL 重相锁凝胶管中并再次用另外的 1mL 氯仿萃取。在高于 13,000 rpm 离心 2 分钟。

9) 将水层转移到硅化的 1.5mL 离心管中，并加入 10ul 5M NaCl，3ul 线性聚丙烯酰胺和 0.8mL 的 100％乙醇在-20℃条件下沉淀过夜。