天净沙系列

CAT#:240725-2

低温运输、4℃保存

天净沙

交联免疫沉淀及 qPCR 试剂盒

Cross-Linking Immunoprecipitation and qPCR Kit

使用手册 V0.5

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

本产品是交联免疫沉淀及 qPCR 试剂盒，它具有以下特点：

1. 本产品即开即用，不需要用户优化各种条件。
2. 适用于培养细胞、悬浮细胞和实体组织。
3. 使用的琼脂糖微珠的普适性更广，非特异结合也更低。
4. 足够 30 次 ChIP 实验和 50 次 qPCR 反应。每次 ChIP 实验可处理 1E6 个细胞（或 100 mg 实体组织），每次染料法 qPCR 反应体系为 20 μL。
5. 所得DNA扩增产品可用于芯片分析和Illimina高通测序。本产品不含相关试剂。
6. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用小扁盒+两个 11 孔盒包装

小扁盒：ChIP 试剂盒，240725-2pt1，常温运输，4℃保存。

成分	编号	规格	包装
ChIP 交联液	240725a	10 mL	10 mL 棕色瓶
ChIP 中和液	240725b	10 mL	10 mL 本色瓶
ChIP 细胞裂解液	240725c	5 mL	5 mL 本色瓶子
ChIP 解交联液	240725d	1 mL	1.5 mL 本色管
去蛋白酶溶液	230507	30 mL	30 mL 棕玻瓶
微量核酸沉淀剂	2203130	30 mL	30 mL 本色瓶
ChIP 洗涤液 1	240725e	30 mL	30 mL 本色瓶
ChIP 洗涤液 2	240725f	30 mL	30 mL 本色瓶
ChIP 洗涤液 3	240725g	30 mL	30 mL 本色瓶
ChIP 免疫沉淀微珠	240725h	3 mL	5 mL 本色瓶
ChIP DNA 释放液 A	240725i	600 μL	1.5 mL 本色管
使用手册	240725-2sc	1 份	无

11 孔盒：ChIP-qPCR 试盒，240725-2pt2，低温运输，-20℃保存。

成分	编号	规格	包装
PMSF 溶液	240725k	1 mL	1.5 mL 本色管
ChIP DNA 释放液 B	240725j	600 μL	1.5 mL 红盖管
2×SYBR qPCR MasterMix	990408	0.5 mL	1.5 mL 本色管

运输及保存

见上表，有效期一年。

自备物品

样本、PBS、DNA 结合蛋白一抗。

使用方法

一、制备交联细胞裂解液

1. 交联：在将细胞培养到合适浓度，按 1 mL 细胞培养基加入 27 μL ChIP 交联

液的比例加入 ChIP 交联液，轻柔摇匀。37℃放置 10 分钟进行交联。

2. 中和：加入 1/10 体积的 ChIP 中和液体轻柔摇匀，室温放置 5 分钟。在此期间将 PMSF 溶液按 1:200 的比例加入到自备的 PBS 中，混匀，得 PBS-PMSF 混合液，放冰上待用。此溶液必须新鲜配制。
3. 将所有液体培养基吸干净，冰上放置。
4. 用跟细胞培养基等体积的预冷 PBS-PMSF 混合液洗涤细胞一次。
5. 加入细胞培养基 1/10 体积的预冷 PBS-PMSF 混合液收集细胞，然后按每管 1E6 个细胞分装。一次最好准备不少于 30 管进行 ChIP，减少细胞差异。
6. 4℃ 1000×g 离心 2 分钟沉淀分装的细胞，吸弃上清。冰上放置待用，每次实验没用完的细胞沉淀可以放-80℃保存。

二、首次实验时超声条件优化

7. ChIP 实验的最适 DNA 长度在 400-800 bp 之前，但对不同细胞株系和同一细胞株系的不同生长阶段，要得到此长度的 DNA，所用超声打断的参数可能有所不同，故需要对超声打断 DNA 的条件进行优化。
8. 取 4 管第 6 步制备的细胞，在管上标记为 2，4，6，8 号，每管中分别加入 1 μL PMSF 溶液和 200 μL ChIP 细胞裂解液，轻柔重悬，冰浴 10 分钟裂解细胞。
9. 用直径 2 mm 的超声头进行超声打断，功率设置为 50 W，最大输出设置为 30%，每次 10 秒，上述 4 管分别进行 2 次、4 次、6 次和 8 次超声打断。为避免产热，超声打断时样本一定要放冰上。
10. 每管中加入 8 μL ChIP 解交联液并混匀，65℃保温 5 小时。
11. 加入等体积（200 μL）去蛋白溶液，涡旋振荡混匀 1 分钟，13000×g 常温离心 3 分钟，转移上清到一新的离心管中。
12. 重复上步操作一次。
13. 加入两倍体积（0.4 mL）微量核酸沉淀剂，颠倒 30 次混匀，13000×g 常温离心 10 分钟，小心吸弃上清。
14. 加入 1 mL 自备 75%乙醇，颠倒 10 次混匀，13000×g 常温离心 3 分钟，小心吸弃上清。
15. 空管离心半分钟，小心吸弃约 50 μL 残留上清。
16. 加入 50 μL 自备 TE 溶解 DNA 沉淀，取 10 μL 电泳。选择 DNA 片段长度在 400-800 bp 之间的超声断裂条件为本批次细胞的最优超声打断条件。

三、按最优超声打断条件进行 ChIP

17. 用最佳超声打断条件按上面的操作对第 6 步所得样本进行超声打断。
18. 4℃ 13000×g 离心 5 分钟，小心转移上清（约 200 μL）到新离心管中。

	19. 加入 1 μg 自备的 DNA 结合蛋白专一性的抗体，充分轻柔吹打混匀，冰上放置 30 分钟。还需要设置一个不加抗体只有细胞裂解液的对照，对照的操作同样本。 20. 在 2 个新离心管中分别加入 80 μL 蛋白 A/蛋白 G 琼脂糖微珠，4℃ 1000×g 离心 1 分钟，小心吸弃上清。 21. 小心将第 19 步的两个管的混合液转移到上步所得两管琼脂糖微珠沉淀中，轻柔吹打混匀，冰上放置 30 分钟-过夜（具体时间取决于所用抗体和蛋白 A/蛋白 G 琼脂糖微珠的亲和力，需要自行优化摸索最适保温时间）。 22. 4℃ 1000×g 离心 1 分钟，小心吸弃上清（保留上清，若实验失败时查找原因）。 23. 在沉淀中加入 1 mL ChIP 洗涤液 1，摇床 4℃缓慢混匀 5 分钟。4℃ 1000×g 离心 1 分钟，小心吸弃上清（可保留上清以便实验失败时查找原因）。此步可以洗涤去除弱亲和蛋白质-DNA 非特异性结合复合物。 24. 用 1 mL ChIP 洗涤液 2 重复上步操作 1 次（可保留上清以便实验失败时查找原因）。此步可以洗涤去除中等亲和蛋白质-DNA 非特异性结合复合物。 25. 用 1 mL ChIP 洗涤液 3 重复上步操作 1 次。此步可以洗涤去除高亲和蛋白质-DNA 非特异性结合复合物（可保留上清以便实验失败时查找原因）。 26. 用 1 mL TE 重复上步操作两次（可保留上清以便实验失败时查找原因）。所得沉淀即是 DNA-结合蛋白-结合蛋白抗体-琼脂糖微珠的复合物。 **四：回收靶 DNA** 27. 在上步 DNA-结合蛋白-结合蛋白抗体复合物沉淀中加入 20 μL ChIP DNA 释放液 A、20 μL DNA 释放液 B 和 160 μL 超纯水，吹打混匀，65℃保温 4 小时。此步还要对第 18 步和第 21 步的 N1、N2、N3 三个对照进行相同的处理。 28. 各加入等体积（200 μL）去蛋白溶液，涡旋振荡混匀，13000×g 常温离心 3 分钟，转移上清到一新的离心管中。 29. 重复上步操作一次。 30. 加入两倍体积（0.4 mL）微量核酸沉淀剂，颠倒 30 次混匀，13000×g 常温离心 10 分钟，小心吸弃上清。 31. 加入 1 mL 自备 75%乙醇，颠倒 10 次混匀，空管离心半分钟，小心吸弃残留上清。 32. 加入 50 μL TE 溶解 DNA 沉淀。 33. 用自备引物和本试剂盒提供的 SYBR PCR MasterMix 进行 PCR 检测。
关联产品	ChIP 染色质免疫沉淀试剂盒