天净沙系列

CAT#:240725

低温运输、4℃保存

ChIP 染色质免疫沉淀试剂盒

Chromatin Immunoprecipitation Kit

使用手册 V1.0

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

ChIP 即染色质免疫共沉淀（Chromatin Immunoprecipitation），它以活细胞为材料，用甲醛进行 DNA-特异蛋白质交联，然后分离此段 DNA 进行 PCR 扩增、克隆和测序。它可揭示活细胞内 DNA 和蛋白的相互作用，具有重要意义。本产品就是专门用于 ChIP 的试剂盒，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。每次 ChIP 实验可处理 1E6 个细胞（或 100 mg 实体组织）。
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

本产品使用小扁盒包装

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
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	220313	30 mL	30 mL 本色瓶
蛋白 A/蛋白 G 琼脂糖微珠	C91932-65-0A1	2.5 mL	5 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
PMSF 溶液	C329-98-6 (原 6-2628)	1 mL	1.5 mL 本色管
使用手册	240725sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，4℃保存，其中 PMSF 溶液为低温成分需-20℃保存，有效期一年。

自备物品

样本、PBS、75%乙醇、TE 缓冲液（10 mM Tris-HCl，1 mM EDTA，pH 8.0）、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。同时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（可保留上清以便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，如组蛋白-DNA 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）。 27. 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。可以用于 Western 检测蛋白部分，可以用于 PCR 检测其 DNA 部分。检测时可以带上上面各步所留存的上清。
关联产品	交联免疫沉淀及 qPCR 试剂盒