天净沙系列

CAT#:230770

1 个成分常温运输和保存

2 个成分低温运输和保存

天净沙

ChIP 蛋白结合 DNA 回收及扩增试剂盒

ChIP Protein-Binding DNA Recovery and Amplification 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，然后超声打断 DNA，再用特异蛋白质专一性的抗体分离 DNA-特异蛋白质复合物，解交联，分离纯化 DNA，再进行后续的扩增、克隆和测序等研究。ChIP-Exo 是在传统 ChIP 技术上的增加外切酶处理步骤，本产品就是基于 ChIP-Exo 开发的、专门用于 ChIP 免疫共沉淀后蛋白结合 DNA 片段的回收和扩增的试剂盒，它具有以下特点：

1. 本产品即开即用，提供免疫共沉淀后直到 DNA 扩增的所有试剂，不需要用户优化各种条件。
2. 通过外切酶降解无关 DNA，故背景比常规 ChlP（如 ChIP-ChIP 和 ChIP-Seq）都低。
3. 精度更高，结合位点可以短到 14-100 bp，比常规 ChIP 都短。
4. 需要更少的起始 DNA，只需要 50 ng，因此不但可以使用培养细胞，还可以使用实体组织进行 ChIP 实验。而常规 ChIP 需要μg 级别的起始 DNA，不能使用活体组织为起始材料。
5. 使用保证性比 Taq DNA 聚合酶保真性高 200 多倍的超保真 DNA 聚合酶进行扩增，避免了在扩增过程中产生新的突变。
6. 使用沉淀法回收，短 DNA 的丢失少。
7. 实时荧光 PCR 检测 DNA 扩增，便于在最佳扩增效果时停止 PCR。
8. 整个过程只需要 7 小时。
9. 足够 20 次 ChIP-Exo 交联 DNA 回收和 20 次 25 μL 体系的超保真 PCR 扩增。
10. 所得 DNA 可以用于芯片分析和 Illimina 高通测序。
11. 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 孔盒分开包装

小扁盒成分名称和编号：ChIP 试剂盒常温成分，230770pt1

成分	编号	规格	包装
ChIP 沉淀洗涤液 1	230770a	80 mL	120 mL 本色瓶
ChIP 沉淀洗涤液 2	230770b	120 mL	120 mL 本色瓶
去蛋白酶溶液	230507	10 mL	10 mL 棕玻瓶
微量核酸沉淀剂	2203130	20 mL	30 mL 本色瓶
ChIP 试剂盒成分 A	230770pt1	1 盒	11 孔塑料盒
ChIP 试剂盒成分 B	220650pt2	1 盒	11 孔塑料盒
使用手册	230770sc	1 份	无

11 孔盒成分名称和编号：ChIP 试剂盒低温成分 A，230770pt2

成分	编号	规格	包装材料
10×蛋白酶 K 反应液	220137a	0.1 mL	1.5 mL 绿盖管
蛋白酶 K 溶液，10mg/mL	220137b	50 μL	0.5 mL 红盖管
ChIP-Exo 专用 PCR 引物干粉	yw230770	20 次	0.5 mL 本色管
2×SYBR 超保真 PCR MasterMix	220650	250 μL	0.5 mL 棕色管
DNA 接头溶解及复性液	230770	1 mL	白盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 本色管

11 孔盒成分名称和编号：ChIP 试剂盒低温成分 B，230770pt3

成分	编号	规格	包装材料
5×ChIP DNA 末端修复反应液	230770c1	100 μL	0.5 mL 蓝盖管
ChIP DNA 末端修复酶	230770c2	20 μL	0.5 mL 蓝盖管
5×ChIP DNA 接头连接反应液	230770d1	200 μL	0.5 mL 绿盖管
ChIP DNA 接头连接酶 1	230770d2	80 μL	0.5 mL 绿盖管
ChIP DNA 接头连接酶 2	230770d3	60 μL	0.5 mL 绿盖管
5×ChIP DNA 切口修复反应液	230770e1	100 μL	0.5 mL 黄盖管
ChIP DNA 切口修复酶	230770e2	20 μL	0.5 mL 黄盖管
5×ChIP DNA 外切酶反应液	230770f1	100 μL	0.5 mL 红盖管
ChIP DNA 外切酶	230770f2	40 μL	0.5 mL 红盖管
ChIP-Exo 专用接头 A 干粉	ad230770a	20 次	0.5 mL 白盖管
ChIP-Exo 专用接头 B 干粉	ad230770b	20 次	0.5 mL 白盖管

运输及保存

小扁盒需常温运输和保存，两个 11 孔盒成分需低温运输、-20℃保存，有效期一年。

自备物品

样本、75%乙醇、琼脂糖电泳检测及胶回收试剂盒

使用方法

一：准备工作

1. 首次使用本产品时，将 20 μL DNA 接头溶解及复性液分别加入到 ChIP-Exo 专用接头 A 和 ChIP-Exo 专用接头 B 干粉管中，然后在 PCR 仪上 95℃5 分钟，每分钟降低 1℃降低到 25℃，25℃保温 30 分钟，得到 ChIP-Exo 专用接头 A 溶液和 ChIP-Exo 专用接头 B 溶液。放冰上待用。没有用完的需要放-20℃保存。
2. 首次使用本产品时，将 20 μL 超纯水加入到 ChIP-Exo 专用 PCR 引物干粉管中、涡旋震荡 30 秒，短暂离心，得到 ChIP-Exo 专用 PCR 引物溶液，放冰上待用。没有用完的需要放-20℃保存。
3. 如果有可能，最好选择一个阴性对照 DNA 区域和一个阳性对照 DNA 区域并设计 PCR 引物，用于检测实验前后的富集情况。阴性对照 DNA 区域可以选择那些不

可能会跟蛋白结合的 DNA 区域，阳性对照 DNA 区域可以根据文献选择肯定回跟蛋白结合的 DNA 区域。

4. 为避免 DNA-蛋白-抗体复合物解离，所用 ChIP 洗涤液最好放冰上预冷待用。

二：DNA-蛋白-抗体复合物的制备

5. 用常规方法进行 DNA-蛋白交联，交联后超声打断的 DNA 片段长度必须在 100-500 bp 之间，用自选抗体进行染色质免疫共沉淀。本试剂盒每次需要的起始 DNA 对应的起始细胞数为 1E7 个培养细胞、100 mg 实体组织或 50 mL 酵母菌液。其他材料的最佳起始细胞数量需要用户自行摸索。

6. 得到 DNA-蛋白-抗体复合物沉淀后，用 1 mL 冰浴的 ChIP 洗涤液 1 重悬沉淀，脱色摇床上摇晃 5 分钟，室温 100 g 离心 1 分钟，去上清。不能延长洗涤时间，否则 DNA-蛋白-抗体复合体可能解离。

7. 再重复上步洗涤三次（共四次）。

8. 用 1 mL 冰浴的 ChIP 洗涤液 2 洗涤沉淀两次。

三：DNA 末端修饰

9. 在 DNA-蛋白-抗体复合物沉淀中加入 10 μL 5×ChIP DNA 末端修复反应液和 39μL 超纯水，吹打混匀，然后加入 1 μL ChIP DNA 末端修复酶，37℃保温 30 分钟。

10. 在上步反应液中加入冰浴的 ChIP 洗涤液 2，脱色摇床上摇晃 5 分钟，室温 100 g 离心 1 分钟，去上清。

11. 在沉淀中加入 10 μL 5×ChIP DNA 接头连接反应液和 35 μL 超纯水、吹打混匀，然后加入 1 μL ChIP-Exo 专用接头 A 溶液和 4 μL ChIP DNA 接头连接酶 1，25℃保温 60 分钟。

12. 在上步反应液中加入 1 mL 冰浴的 ChIP 洗涤液 2，脱色摇床上摇晃 5 分钟，室温 100 g 离心 1 分钟，去上清。

13. 在沉淀中加入 10 μL 5×ChIP DNA 切口修复反应液和 39 μL 超纯水，吹打混匀，然后加入 1 μL ChIP DNA 切口修复酶，30℃保温 20 分钟。

14. 在上步反应液中加入 1 mL 冰浴的 ChIP 洗涤液 2，脱色摇床上摇晃 5 分钟，室温 100 g 离心 1 分钟，去上清。

15. 在沉淀中加入 10 μL 5×ChIP DNA 外切反应液和 39 μL 超纯水，吹打混匀，然后加入 1 μL ChIP DNA 外切酶，37℃保温 30 分钟。

16. 在上步反应液中加入 1 mL 冰浴的 ChIP 洗涤液 2，脱色摇床上摇晃 5 分钟，室温 100×g 离心 1 分钟，去上清。

四、洗脱及沉淀回收 DNA 片段

17. 加入 5 μL 10×蛋白酶 K 反应液、44 μL 超纯水和 1 μL 蛋白酶 K 溶液（10 mg/mL），65℃保温 16 小时。
18. 加入 450 μL 超纯水，再加入 0.5 mL 去蛋白溶液，涡旋震荡 1 分钟。
19. 室温 15000×g 离心 3 分钟，转移上清到新的离心管中。
20. 在上清中加入 1 mL 微量核酸沉淀剂，颠倒 10 次混匀后室温 15000×g 离心 15 分钟，小心吸出上清，不要触及离心管离心面底部的可能呈小白点的 DNA 沉淀。
21. 在沉淀中加入 1 mL 自备的 75%乙醇,颠倒 10 次后室温 15000×g 离心 5 分钟，小心吸出上清，不要触及离心管离心面底部的可能呈小白点的 DNA 沉淀
22. 室温 10000×g 离心半分钟，小心吸出约 50 μL 的残留液体。
23. 将 DNA 沉淀溶解在 4 μL 5×ChIP DNA 接头连接反应液中，32 μL 超纯水再加入 1 μL ChIP-Exo 专用接头 B 溶液和 3 μL ChIP DNA 接头连接酶 2，25℃保温 60 分钟。

五、实时超保真 PCR 扩增

24. 如果后续需要建立文库进行高通测序，则按相关厂家推荐的方法进行。本试剂盒不含相关试剂。
25. 如果后续需要做 PCR 和克隆，则在一个 PCR 管中分别加入 25 μL 2×实时超保真 PCR MasterMix，1 μL ChIP-Exo 专用 PCR 引物溶液，1 μL 上步制备的 DNA 模板和 23 μL 超纯水。总体积为 50 μL。
26. 按 18-22 步沉淀法纯化 DNA 片段，最后将 DNA 沉淀溶解在 15 μL 超纯水里。
27. 按下表参数进行 PCR 扩增。

过程	温度	时间
PCR 反应 （30 个循环，但荧光信号一般在 13-18 个循环就进入平台期，此时可在72℃停止PCR)	98℃	20 sec
	52℃	60 sec （采集 SYBR 通道荧光信号）
	72℃	60 sec

28. 跑 2%琼脂糖电泳，胶回收 200-500 bp 的片段。本试剂盒不含相关试剂。
29. 所得 DNA 可用于后续克隆、DNA 芯片杂交和高通测序等分析。
30. 测序后将根据连接上的 index 标签 DNA，分成两组数据，一组是蛋白结合 DNA 的一条链，另外一组其互补的另外一条链。蛋白结合区将在这两条 DNA 的互补区域。数据分析时，用户需要向厂家索取所用批次标签 DNA 的序列。

关联产品 ChIP DNA-蛋白-抗体沉淀制备试剂盒