****

**ChIP染色质免疫共沉淀试剂盒**

**ChIP\_Chromatin Immunoprecipitation Kit**

**货号：NR3302M**

[1. 产品介绍 1](#_Toc182836646)

[2. 实验准备和注意事项 2](#_Toc182836647)

[3. 操作步骤 2](#_Toc182836651)

[4. 常见问题 5](#_Toc182836661)

# 1. 产品介绍

ChIP(Chromatin Immunoprecipitation，染色质免疫共沉淀）是研究细胞内DNA与蛋白结合的技术。先用甲醛交联细胞内的“蛋白-DNA”复合物，裂解细胞后，DNA经超声波破碎至特定长度，采用特异性抗体捕获细胞内的诱饵蛋白及其结合的DNA片段，通过protein A/G磁珠沉淀“抗体-诱饵蛋白-结合DNA”复合体，随后将蛋白与DNA解交联，即可提取结合的DNA。该DNA可用于后续的定量PCR检测（qPCR）或高通量测序（seq）。产品可应用于细胞样品的DNA结合蛋白免疫共沉淀实验，具体组分见表1。

表1. ChIP染色质免疫共沉淀试剂盒组分

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 名称 | 12 Tests规格 | 24 Tests规格 | 储存条件 |
| Protein A/G Magnetic Beads | 500 μL | 1 mL | 4℃，1年 |
| Lysis Buffer | 7 mL | 14 mL | 4℃，1年 |
| Wash Buffer | 25 mL | 50 mL | 4℃，1年 |
| Elution Buffer | 400 μL | 800 μL | 4℃，1年 |
| 10xTE Buffer | 550 μL | 1.1 mL | 4 ℃，1年 |
| NaCl(5M) | 250 μL | 500 μL | 4 ℃，1年 |
| Protease inhibitor | 190 μL | 380 μL | -20℃，1年 |
| RNase A | 130 μL | 260 μL | -20℃，1年 |
| Proteinase K | 130 μL | 260 μL | -20℃，1年 |
| 10 mL离心管 | 1管 | 1管 | 常温 |

注：请根据提示，将Protease inhibitor和RNase A放置于-20℃保存，试剂盒置于4℃保存，避免阳光直射。

# 2. 实验准备和注意事项

## 自备试剂

* 抗体：诱饵蛋白的ChIP级别抗体、Normal IgG
* 其他试剂：PBS缓冲液、甲醛、甘氨酸、无水乙醇、80%乙醇、75%乙醇、苯酚、氯仿、异戊醇、ddH2O

## 所需仪器和材料

* 超声仪、低温离心机、混匀仪、磁力架

## 2.3 注意事项

1. 试剂盒采用冰袋运输。收货后，请根据提示，将Protease inhibitor和RNase A放置于-20℃保存，试剂盒置于4℃保存，避免阳光直射。
2. Protease inhibitors 为一种细胞毒性化学物质，建议在通风橱或经认证的生物实验台中使用，且注意避光保存。
3. 在进行实验设计时，建议加入对照组，方便后续实验结果分析。
4. 请勿使磁珠干燥、冷冻或剧烈涡旋，会导致磁珠聚集而降低结合能力。磁珠在使用前，将磁珠反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀磁珠。
5. 经煮沸后会导致磁珠聚集并且失去抗体结合能力，经煮沸的磁珠不应再次使用。

# 3. 操作步骤

## 3.1 细胞交联

(1) 每组取3 × 107个细胞，预冷的 1×PBS漂洗2~3次，彻底去除培养基成分，4°C 1000 g离心5 min收集沉淀。

(2) 加入10 mL 1×PBS（含 270 µL 37%甲醛，甲醛终浓度为 1%）重悬细胞，放混匀仪上室温交联10 min。

(3) 加入1 mL 1.375 M 甘氨酸，放混匀仪上室温孵育5 min，之后将样品置于冰上。

(4) 4 ℃ 1000 g离心5 min收集细胞，弃上清。

(5) 加10 mL预冷的 1×PBS漂洗细胞2~3次，彻底去除交联剂成分，4°C 1000 g离心5 min收集细胞沉淀，液氮速冻3 min，- 80 ℃保存。

## 3.2 细胞裂解及染色质超声打断

(1) 向细胞中加入500 μL Lysis Buffer、5 μL Protease inhibitor（按1:100添加），吹打混匀，冰浴10 min。

(2) 将以上样品置于超声破碎仪中进行染色质超声破碎：

* 超声时样品需置于冰浴中，保持较低温度，以防染色质过热变性。
* 不同型号的超声仪，超声条件可能有异，建议根据预实验或经验来确定，使DNA片段大小在合适范围，最佳超声条件可产生的染色质片段化至100bp-1kb，超声不足或超声过度都会影响结果。摸索超声条件时，可先确定每次超声多长时间不会导致明显发热，再摸索不同的超声次数，进行多次对比。

**参考条件：**非接触式全自动超声波破碎仪，高功率，30 s +30 s冰上超声28轮，或接触式超声仪35%功率，2 s+5 s冰上超声破碎细胞15 min。

1. 待细胞溶液变澄清，4℃ 13000 g离心10 min，取上清至新的离心管中，即为交联的染色质；取5μl解交联后进行电泳检测染色质片段大小。取 30 µL样本作为input检测，剩余样本于- 80 ℃保存。

\* 注意：

i. 如果样本中诱饵蛋白丰度较低，或诱饵蛋白与待测DNA结合较弱，也可以增加初始样本量，当样本增加时，裂解液缓冲液和抑制剂可等比例增加。300 μL为最小孵育体积，但总孵育体积最大不超过离心管体积的2/3。

ii. 超声过程需保持低温以防染色质过热变性，超声条件因细胞类型和超声设备而异，以上仅为参考，使用时请务必提前摸索好合适的超声打断条件使DNA片段大小在合适范围，若片段偏大需再次进行超声。

## 3.3 解交联

（1）取5 µL DNA样品65℃孵育 6 h或者过夜。

（2）每管加入1.5 µL RNase A，颠倒混匀 10~15次，37 ℃孵育0.5~2 h。

（3）每管加入1.5 µL Proteinase K，55℃孵育2 h。

（4）对解交联后的DNA进行电泳检测片段大小，打断的DNA通常在100-1000 bp中间，ChIP-Seq要求DNA片段最好在100-500 bp之间，ChIP-qPCR要求DNA片段最好在300~1000 bp之间。

## 3.4 漂洗液准备

取出10 mL离心管，加入2 mL Wash Buffer、10 μL Protease inhibitor（漂洗液与蛋白酶抑制剂按200：1添加），混合均匀，冰上保存，现配现用。

\* 注意：本次实验为1组用量，如设计多组样本，请按照实际使用量配置。

## 3.5 磁珠漂洗

a. 每组实验取40 μL 的Protein A/G Magnetic Beads，加入**步骤3.4**的200 µL 漂洗液，颠倒混匀30次，放磁力架上静置1 min使磁珠全部吸附于磁力架，弃上清。

b. 再次加入**步骤3.4配置**的200 µL 漂洗液，颠倒混匀30次，放磁力架上静置1 min使磁珠全部吸附于磁力架，弃上清。

## 3.6 ChIP染色质免疫共沉淀

(1) 向**步骤3.2制备**的样本裂解液中加入适量抗体（按照抗体说明书添加），放混匀仪上室温孵育1~2 h或 4 ℃过夜。

(4) 向**步骤3.5制备**的磁珠中加入步骤（1）的样本/抗体混合物，放混匀仪上4 ℃孵育2 h，放磁力架上静置1 min并弃上清。

(5) 加入500 μL**步骤3.4配置**漂洗液，颠倒混匀30次，放磁力架上静置1 min并弃上清；重复该漂洗操作1次。

(6) 再次加入500 μL**步骤3.4配置**漂洗液，颠倒混匀30次，之后取 100 μL移入新的离心管中用于蛋白检测（标注为管1），剩余400 μL用于DNA提取（标注为管2）；两管分别放磁力架上静置1 min并弃上清。

## 3.7 洗脱

a. 向管1中加入20 μL 1×上样缓冲液并煮沸 3 min，放磁力架上静置1 min，收集上清至新的无 RNase 离心管中，用于诱饵蛋白Western-Blot检测。

b. 向管2中加入30 μL Elution Buffer，涡旋震荡 20s，放混匀仪上室温洗脱10~15 min，涡旋震荡 20s；1000 g离心20 s，放磁力架上静置1 min，收集上清新的无 RNase 离心管中。

## 3.8 解交联

(1) ChIP组样品置于65℃孵育 6 h或者过夜。

(2) 每管加入8 µL RNase A，颠倒混匀 10~15次，37 ℃孵育0.5~2 h。

(3) 每管加入8 µL Proteinase K，55℃孵育2 h。

## 3.8 DNA分离纯化

（1）每管加入330 μL ddH2O、40 μL 10x TE缓冲液，再400 µL苯酚：氯仿：异戊醇混合液（25:24:1），颠倒混匀10~15次，室温13000 g离心10 min，转移上层水相到新的离心管中。

（2） 每管加入20 µL 5 M NaCl和1 mL无水乙醇，-20 ℃沉淀2 h或过夜，4 ℃ 16000 g离心 30 min，去上清。

（3）加入500 µL 80%乙醇洗涤沉淀，4 ℃ 16000 g离心30 min，去上清，开盖晾干乙醇。

（4）加入20 µL ddH2O，溶解沉淀DNA。

# 4. 常见问题

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **问题** | **原因分析** | **解决方案** |
| 染色质无法打断/太短 | 交联时间过长/过短 | 改善交联时长 |
| 超声条件不合适 | 重新摸索超声条件 |
| 获得的诱饵蛋白量少 | 抗体无法结合诱饵蛋白 | 更换抗体，可以选择另一种识别不同抗原表位的抗体 |
| 样品中的诱饵蛋白含量低 | 提高样本用量 |
| 获得的DNA量少 | 样本量不够 | 提高细胞用量，或增加细胞量与抗体磁珠的比例 |
| 洗脱下的抗体条带掩盖了诱饵蛋白 | 诱饵蛋白的分子量大约是 50kDa 或25kD | Western blot选择特异性抗重链或轻链的二抗 |
| Western blot选择与ChIP实验不同种属的抗体 |