

# Chromatin Immunoprecipitation ChIPMax Kit

货号：NR3121C

## 目 录

1. 产品介绍.....	1
2. 试剂盒操作流程图.....	2
3. 试剂盒操作说明.....	3
5. 注意事项.....	6
6. 常见问题.....	6

## 1. 产品介绍

### 1.1 试剂盒简介

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。

Chromatin Immunoprecipitation ChIPMax Kit 是为染色质免疫沉淀 (ChIP) 实验精心设计的一站式解决方案。

它整合了优化的缓冲液系统、高性能的亲介质和经过验证的实验流程, 旨在帮助研究者高效、可靠地富集与特定蛋白质 (如转录因子、组蛋白修饰、辅因子等) 结合的 DNA 片段。本试剂盒具有以下的核心优势:

- ✧ 卓越的信噪比: 独特的洗涤配方有效降低非特异性背景, 确保富集片段的高度特异性, 为下游分析 (qPCR, ChIP-seq) 提供纯净的数据。
- ✧ 高效结合与洗脱: 优化的抗体-染色质结合条件及温和高效的洗脱缓冲液, 最大化目标复合物的回收率。
- ✧ 操作简便省时: 流程经过精心优化和标准化, 显著缩短手工操作时间, 减少步骤间差异, 提升实验可重复性, 即使是 ChIP 新手也能快速上手并获得可靠结果。
- ✧ 广泛兼容性: 兼容多种抗体类型 (单抗、多抗), 并能无缝衔接下游的 qPCR 或高通量测序 (ChIP-seq) 平台。

◇ 稳定可靠：所有组分均经过严格的质量控制和批次间一致性测试，确保实验结果的稳定性和可重复性。

## 1.2 适用研究领域

转录调控机制研究、表观遗传学（组蛋白修饰图谱）、蛋白质-DNA 相互作用、疾病相关基因调控网络解析等。

## 1.3 试剂盒组分

表 1. Chromatin Immunoprecipitation ChIPMax Kit 组分

名称	12 Tests 规格	24 Tests 规格	储存条件
Protein A/G Magnetic Beads	500 $\mu$ L	1 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
Lysis Buffer	7 mL	14 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
Wash Buffer	25 mL	50 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
Elution Buffer	400 $\mu$ L	800 $\mu$ L	4 $^{\circ}$ C, 1 年
10xTE Buffer	550 $\mu$ L	1.1 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
5M NaCl	250 $\mu$ L	500 $\mu$ L	4 $^{\circ}$ C, 1 年
Protease inhibitor	190 $\mu$ L	380 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
RNase A	130 $\mu$ L	260 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
Proteinase K	130 $\mu$ L	260 $\mu$ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年

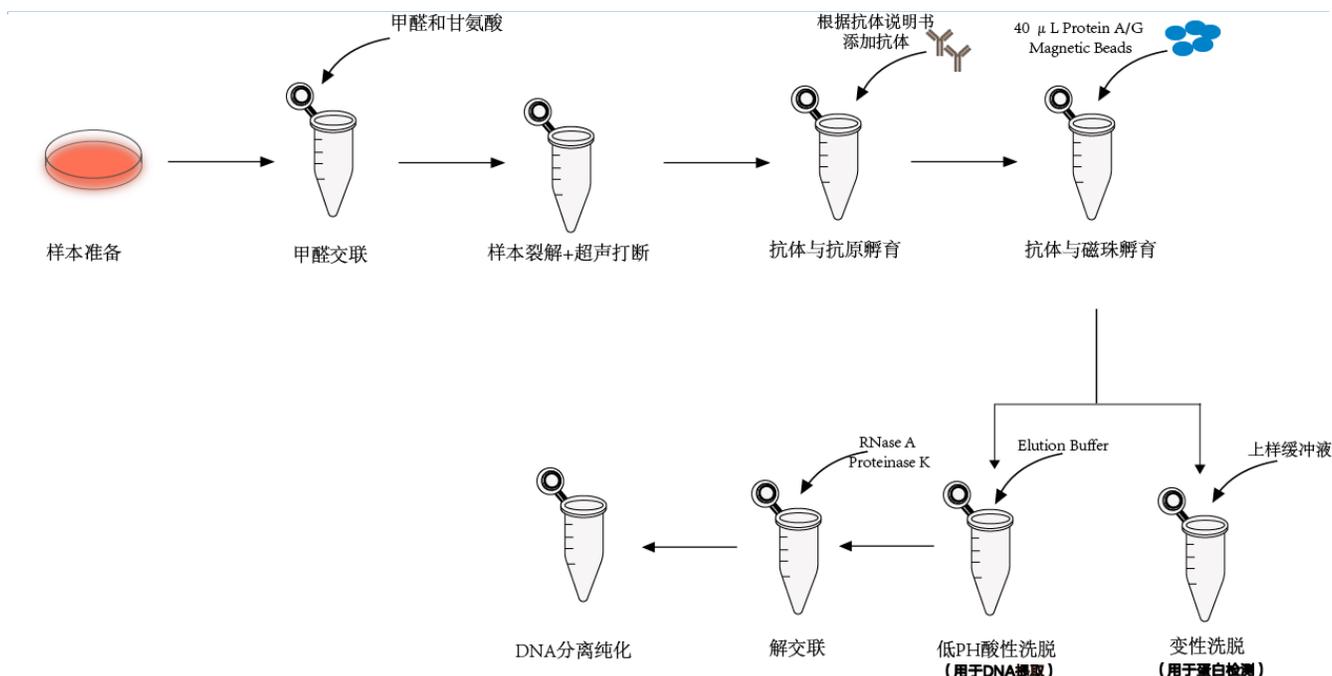
\* 注意：请根据提示，将 Protease inhibitor、RNase A 和 Proteinase K 放置于-20 $^{\circ}$ C保存，试剂盒置于 4 $^{\circ}$ C保存，避免阳光直射。

**另外，本试剂盒不包含所有必需试剂/耗材，请参照清单另行准备：**

试剂：① 诱饵蛋白 IP 抗体（建议选用 ChIP 抗体）；② Normal IgG；③ PBS 缓冲液；④ 甲醛；⑤ 甘氨酸；⑥ 无水乙醇；⑦ 80%乙醇；⑧ 苯酚；⑨ 氯仿；⑩ 异戊醇；⑪ ddH<sub>2</sub>O。

仪器：① 超声仪（用于裂解样本）；② 低温离心机；③ 混匀仪；④ 磁力架；

## 2. 试剂盒操作流程图



### 3. 试剂盒操作说明

\* 注意：以下操作均为 1 组用量，设计多组样本，试剂用量请按照实际使用量配置。如设计实验组和对照组，则为操作说明用量的 2 倍，以此类推。

#### 3.1 细胞交联

- (1) 每组取  $3 \times 10^7$  个细胞，预冷的  $1 \times \text{PBS}$  漂洗 2~3 次，彻底去除培养基成分， $4^\circ\text{C}$  1000 g 离心 5 min 收集沉淀。
- (2) 加入 10 mL  $1 \times \text{PBS}$  (含 270  $\mu\text{L}$  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)  $4^\circ\text{C}$  1000 g 离心 5 min 收集细胞，弃上清。
- (5) 加 10 mL 预冷的  $1 \times \text{PBS}$  漂洗细胞 2~3 次，彻底去除交联剂成分， $4^\circ\text{C}$  1000 g 离心 5 min 收集细胞沉淀，液氮速冻 3 min， $-80^\circ\text{C}$  保存。

#### 3.2 细胞裂解及染色质超声打断

- (1) 向细胞中加入 500  $\mu\text{L}$  Lysis Buffer、5  $\mu\text{L}$  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，超声 30 s，暂停 30 s，超声 28 轮，或接触式超声仪 35%功率，超声 2 s，暂停 5 s 冰上超声破碎细胞 15 min。

- (1) 待细胞溶液变澄清，4°C 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 °C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 DNA 样品 65°C 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 °C 孵育 0.5~2 h。
- (3) 每管加入 8 μL Proteinase K，55°C 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 1.9 mL Wash Buffer、9.5 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。

### 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**的样本裂解液中按抗体说明书加入适量抗体/Normal IgG，放混匀仪上室温孵育 1~2 h 或 4 °C 过夜。
- (4) 向**步骤 3.5 制备**的磁珠中加入**上述步骤 (1)** 的样本/抗体混合物，放混匀仪上 4 °C 孵育 2 h，放磁力架上静置 1 min 并弃上清。
- (5) 加入 500  $\mu$ L **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  $\mu$ L **步骤 3.4 配置**漂洗液，颠倒混匀 30 次，之后取 100  $\mu$ L 移入新的离心管中用于蛋白检测（标注为管 1），剩余 400  $\mu$ L 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  $\mu$ L 1 $\times$ 上样缓冲液并煮沸 3 min，放磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中，用于诱饵蛋白 Western-Blot 检测。
- b. 向管 2 中加入 30  $\mu$ L 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，收集上清新的离心管中。

### 3.8 解交联

- (1) ChIP 组样品置于 65°C 孵育 6 h 或者过夜。
- (2) 每管加入 8  $\mu$ L RNase A，颠倒混匀 10~15 次，37 °C 孵育 0.5~2 h。
- (3) 每管加入 8  $\mu$ L Proteinase K，55°C 孵育 2 h。

### 3.8 DNA 分离纯化

- (1) 每管加入 330  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O、40  $\mu$ L 10x TE 缓冲液，再 400  $\mu$ L 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  $\mu$ L 5 M NaCl 和 1 mL 无水乙醇，-20 °C 沉淀 2 h 或过夜，4 °C 16000 g 离心 30 min，去上清。
- (3) 加入 500  $\mu$ L 80%乙醇洗涤沉淀，4 °C 16000 g 离心 30 min，去上清，开盖晾干乙醇。
- (4) 加入 20  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O，溶解沉淀 DNA。

---

## 4. 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°C保存, 试剂盒置于 4°C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) 为了您的健康, 请穿戴实验服并佩戴一次性手套进行实验操作。

## 5. 常见问题

### Q: 获得的 DNA 复合产物少的原因有哪些? 怎么解决?

- (1) 样本量较少, 可通过提高细胞样本用量或增加细胞量与抗体磁珠的比例来解决;
- (2) 孵育时间较短, 可延长孵育时间, 但需要注意孵育时间过长也可能会导致非特异性结合增多;

### Q: 诱饵蛋白条带大小与抗体非特异性条带重叠了, 怎么解决?

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, 或 Western blot 选择与 CHIP 实验不同种属的抗体。

### Q: 获得的诱饵蛋白量少, 怎么解决?

- (1) 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。
- (2) 样品中的诱饵蛋白含量低, 提高样本用量。

### Q: 染色质无法打断或打的太短, 怎么解决?

- (1) 交联时间过长/过短, 改善交联时长
- (2) 超声条件不合适, 重新摸索超声条件