HA/DYKDDDDK/Myc/GFP-Magnetic ChIP Assay kit

货号：CH1581/CF1581/CM1581/CG1581

存储条件：4°C 保存

产品说明

CHIP 检测试剂盒用于通过免疫沉淀来沉淀和目标蛋白结合的染色质片段，最后通过 PCR 或 Southern 等方法来检测沉淀的染色质片段的试剂盒。通常用于检测特定的转录因子或组蛋白等基因组 DNA 结合蛋白是否和预期的特定基因组 DNA 序列在同一复合物中。通过 ChIP 检测可以获得在体的(In Vivo)目标蛋白和预期基因组 DNA 片段是否在同一复合物中的结论。ChIP 的检测结果则可明确说明这种结合在细胞内是真实发生的。

本 ChIP 检测试剂盒采用 HA/DYKDDDDK/Myc/GFP-Nanoab-Magnetic beads 作为 CHIP 下拉的珠子，具有载量高结合力强、省时高效的特点。试剂盒提供预混合的对照引物 (Control Primers)，可用于扩增 human GAPDH 的部分相应序列，引物序列为：5’-TACTAGCGGTTTTACGGGCG-3’；5’-TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA-3’。

产品组分：

货号	名称	规格
HNM-25-1000 或 FNM-25-1000 或 MNM-25-1000 或 GNM-25-1000	HA-Nanoab-Magnetic beads DYKDDDDK-Nanoab-Magnetic beads Myc-Nanoab-Magnetic beads GFP-Nanoab-Magnetic beads	1 ml
CP0581-1	Glycine Solution (10X)	30 ml
CP0581-2	ChIP Dilution Buffer	48 ml
CP0581-3	Low Salt Immune Complex Wash Buffer	24 ml
CP0581-4	High Salt Immune Complex Wash Buffer	24 ml
CP0581-5	LiCl Immune Complex Wash Buffer	24 ml
CP0581-6	TE Buffer	48 ml
CP0581-7	0.5M EDTA	250 μl
CP0581-8	5M NaCl	500 μl
CP0581-9	1M Tris, pH 6.5	500 μl
CP0581-10	SDS Lysis Buffer	10 ml
CP0581-11	Control Primers (5μM each)	0.1 ml

操作步骤（仅供参考）：

一、样品超声处理条件的优化：

1. 准备适量预冷的 PBS，以及 100mM PMSF。将 SDS Lysis Buffer 适当温浴使其中的 SDS 充分溶解，并混匀。
2. 将细胞培养于 10cm 细胞培养皿中，细胞培养液的用量为 10 ml。在预期发生目的蛋白和基因组 DNA 结合的时间直接向细胞培养液中加入适量甲醛，轻轻混匀，至最终浓度为 1%。然后在 37°C 孵育 10 分钟，以交联目的蛋白和相应的基因组 DNA。例：10cm 细胞培养皿中加入 10ml 细胞培养液的情况下需加入 270ul 37%甲醛。请注意尽量使用高质量、有效使用期限内的甲醛。细胞也可以培养于 6cm 细胞培养皿中，相关溶液的用量需按照比例进行调整。
3. 加入 1.1ml Glycine Solution (10X)，轻轻混匀。室温放置 5 分钟。
4. 将有细胞样品的培养皿置于冰浴上。吸出含甲醛和 glycine 的培养液，尽量保持没有液体残留。

5. 室温放置 5 分钟，期间用预冷的 PBS 稀释 100mM PMSF 至 1mM，即配制成冰浴预冷的含 1mM PMSF 的 PBS。 PMSF 水性溶液一定要新鲜配制，其在水相中的半衰期约为 30min。

6. 加入 5-10ml 预冷的 PBS（含 1mM PMSF），洗涤细胞，吸尽液体，尽量保持没有液体残留。

7. 再加入 5-10ml 预冷的 PBS（含 1mM PMSF），进一步洗涤细胞，吸尽液体，尽量保持没有液体残留。

8. 加入 1ml 预冷的 PBS（含 1mM PMSF），用细胞刮子刮下细胞，收集至离心管中。如细胞可以用枪吹打下来，也可以用枪吹打。对细胞进行计数，分装成每管大约 100 万细胞。

9. 4ºC，800-1000g 离心 1-2 分钟，充分沉淀细胞。如果发现沉淀不充分，可以适当延长离心时间。吸尽上清，尽量减少液体残留。

10. 配制适量含有 1mM PMSF 的 SDS Lysis Buffer。上步骤的 100 万细胞沉淀用 0.2ml 含有 1mM PMSF 的 SDS Lysis Buffer 重悬。

11. 在冰浴上孵育 10 分钟，以充分裂解细胞。

12. 超声处理，以剪切基因组 DNA，使 DNA 大部分断裂成 200-1000bp 大小，如能将大部分片段控制在 400-800bp 则更佳。超声过程中请注意要保持样品处于冰浴中保持较低温度。超声剪切的效果在后续去交联后可以用常规的 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测。超声处理的条件通常可设置为 10 秒每次，共 3-4 次，功率为 50W 时设置为最大功率的 30%，采用 2mm 超声头。

不同的超声处理仪器的设置不太一样，摸索超声条件时，可以先固定其他条件，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。直至找到比较合适的超声次数可使大部分基因组 DNA 断裂成 200-1000bp 大小。需注意每次的超声体积和细胞用量宜固定，否则就不能使用一个相对比较固定的超声条件用于后续实验。

注：在对超声后基因组 DNA 大小进行检测时，如果采用琼脂糖凝胶点染法（即将核酸染料添加到 loading buffer 中的方式）或者胶染法，由于电泳时 SDS 会与此类染料结合形成异常条带，条带通常在 500-1000bp 左右，因此会对超声后基因组 DNA 大小的判断造成一定的影响。建议采用后染法进行条带大小的检测，使用该方法不会有异常条带出现，不影响对超声后基因组 DNA 大小的判断，而且条带大小更准确。

13. 在 0.2ml 经过超声处理的样品中加入 8ul 5M NaCl，混匀。65ºC 加热 4 小时，以去除蛋白和基因组 DNA 之间的交联。

14. 加入等体积的 Tris 平衡苯酚，vortex 剧烈混匀，随后 4ºC，12000g 左右离心 5 分钟。吸取上清至另一离心管中。

15. 加入等体积氯仿，vortex 剧烈混匀，随后 4ºC，12000g 左右离心 5min。吸取上清至另一离心管中。

注： 上述步骤 14 和 15 的酚氯仿抽提可以使用 DNA 纯化试剂盒进行操作。

16. 取少量通过酚氯仿抽提或 DNA 纯化试剂盒获得的液体，对于酚氯仿抽提产物可以取 5-10ul，对于 DNA 纯化试剂盒纯化产物可以取 2-5ul，进行琼脂糖凝胶电泳，观察超声处理对于基因组 DNA 的剪切效果。

二、染色质免疫沉淀：

1. 在对样品超声处理条件进行优化后，对于待检测样品按照**样品超声处理条件的优化**中 **1-11** 的步骤进行操作，并参考步骤 12 进行超声处理。

2. 对于经过超声处理的样品在 4ºC，12000-14000g 离心 5min。取上清(约 0.2ml)至 2ml 离心管中，置于冰浴。

3. 配制适量含有 1mM PMSF 的 ChIP Dilution Buffer。加入 1.8ml 含有 1mM PMSF 的 ChIP Dilution Buffer 以稀释经过超声处理的样品，使最终体积为 2ml。

4. 取出 20ul 样品作为 Input 用于后续检测。取 **20ul HA/DYKDDDDK/Myc/GFP-Nanoab-Magnetic beads** 添加 PBS 或者 TBST 溶液至 500ul 进行吹打清洗，置于磁力架上用移液器小心洗掉上清，重复清洗 2-3 次（为更好的减少非特异性 1 也可以用 1-5% BSA 或 脱脂牛奶 预处理 Beads 1 小时） 。

5. 将清洗或者封闭好的 **20ul HA/DYKDDDDK/Myc/GFP-Nanoab-Magnetic beads** 加入步骤 3 剩余的样品中，同时可用无细胞样品的溶液作为空白对照，以及不加 beads 样品作为阴性对照，或用无关的抗体作为阴性对照。在 4ºC 缓慢转动或摆动混匀 30- 60min，以沉淀目的蛋白或相应的复合物。

6. 将以上含有样本的离心管置于磁力架上 10s。非常小心地去除上清，切勿触及沉淀。随后依次用如下溶液对沉淀进行洗涤，每次洗涤液的用量为 1ml，每次在 4ºC 缓慢转动或摆动洗涤 3-5min，随后置于磁力架上 10s。小心去除上清液体，切勿触及沉淀。

(a) Low Salt Immune Complex Wash Buffer 洗涤一次。

(b) High Salt Immune Complex Wash Buffer 洗涤一次。

(c) LiCl Immune Complex Wash Buffer 洗涤一次。

(d) TE Buffer 洗涤两次。

注： 完成上述所有洗涤步骤后所获得的沉淀即可用于 PCR 扩增目的基因序列或用 Southern 检测目的基因序列， 或者用于 Western 检测等。

三、PCR 扩增目的基因序列(如 ChIP 产物用于检测目的基因序列)：

1. 新鲜配制适量 Elution buffer (1% SDS, 0.1M NaHCO3)。

2. 完成步骤**免疫沉淀步骤**第 **7** 步后，即完成所有洗涤步骤后，加入 250ul Elution buffer。Vortex 混匀，室温转动或摆动继续洗脱 3-5min。

3. 置于磁力架上分离 10 秒，将上清转移到一新的离心管中。沉淀中再加入 250ul Elution buffer。Vortex 混匀，室温转动或摆动继续洗脱 3-5min。

4. 置于磁力架上分离 10 秒，取出上清。和上一步骤即步骤 3 中获得的上清合并。共计约 500ul 上清。

5. 在 500ul 上清中加入 20ul 5M NaCl，混匀。65°C 加热 4 小时，以去除蛋白和基因组 DNA 之间的交联。对于步骤 2D 获得的作为 Input 的 20ul 样品，加入 1ul 5M NaCl，混匀，65°C 加热 4 小时，同样用于去除蛋白和基因组 DNA 之间的交联。此步骤完成后可以继续进行后续步骤，也可先 -20°C 冻存，第二天继续后续步骤。

注 1：此时的样品已经可以用于 PCR，可以尝试使用 1、2、5 或 10ul 样品作为模板用于 PCR 检测目的基因。此时 PCR 的效果和可能被沉淀下来的 DNA 的量，以及整个 PCR 扩增体系是否容易扩增目的基因有关。如果发现 PCR 效果欠佳，可以考虑通过后续的纯化步骤，纯化并浓缩样品再进行 PCR 检测。

注 2：通常情况下，推荐进行后续纯化后再进行 PCR 检测，Input 一般无需进行后续纯化步骤。

6. 在约 520ul 样品中加入 10ul 0.5M EDTA，20ul 1M Tris pH 6.5 和 1ul 20mg/ml 蛋白酶 K。混匀后 45°C 孵育 60 分钟。

7. 加入等体积 Tris 平衡苯酚，vortex 剧烈混匀，随后 4°C，12000g 左右离心 5 分钟。吸取上清至另一离心管中。

8. 加入等体积氯仿，vortex 剧烈混匀，随后 4°C，12000g 左右离心 5 分钟。吸取上清至另一离心管中。

9. 加入 20ug glycogen 或 yeast tRNA，加入 1/10 体积的 3M NaAc，pH5.2，再加入 2.5 倍体积无水乙醇。混匀后-70°C 沉淀不少于 1 小时，或 -20°C 沉淀 8 小时以上。

10. 4°C，12000-14000g 离心 10 分钟，小心吸去大部分上清，切勿触及沉淀。

11. 加入约 1ml 70%乙醇洗涤沉淀。4°C，12000-14000g 离心 10min，小心吸去大部分上清，切勿接触沉淀。

12. 4°C，12000-14000g 离心 1min，小心吸除残留液体。

13. 用少量 TE 或水重悬 DNA 沉淀，用于目的基因的 PCR 检测。用于 PCR 的引物最好能设计 2 组，可以用 Input 作为模板预先摸索出相应的 PCR 条件，并选择一组效果较好的引物用于最终的 PCR 检测。少数情况下，当 PCR 条带过弱时，可以采用 nested PCR 技术，进行两轮扩增。

注：步骤 7 至步骤 13 也可采用适当的 DNA 纯化试剂盒纯化 DNA。

四、 Western 检测 ChIP 产物(如果 ChIP 产物用于 Western 检测)：

1. 接步骤**染色质免疫沉淀**第 8 步，在完成所有的洗涤步骤后，加入 25ul SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(1X)。SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(1X)可以用 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5X)用水稀释配制而成。沸水浴煮沸 10 分钟。

2. 取 10-20ul 用于 Western 检测。

注意事项：

1、需自备 37%甲醛，PBS，PMSF，Elutioin (1% SDS, 0.1M NaHCO3)，蛋白酶 K，Glycogen 或 tRNA，Tris 平衡苯酚，氯仿，95%乙醇，70% 乙醇，3M NaAc (pH5.2)以及磁力架、细胞刮子或细胞铲子。

2、需自备超声样品处理仪(sonicator)，也称超声粉碎机或超声细胞粉碎机。

3、使用甲醛时请在通风橱中进行操作。

4、本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。

6、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。