

ChIP 检测试剂盒

货号: CP0581

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 Protein A+G Agarose, 比 Protein A Agarose 或 Protein G Agarose 适合于免疫沉淀更多种类的抗体, 包括 mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, rat IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, rabbit IgG, rabbit and goat polyclonal Abs, 以及 human IgG1, IgG2, IgG3 和 IgG4。

本试剂盒中经过 Salmon Sperm DNA 预饱和的 Protein A+G Agarose 和目的基因组 DNA 的非特异性结合大大下降。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' -TACTAGCGTTTTACGGGCG-3'; 5' -TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA-3'。

产品组分:

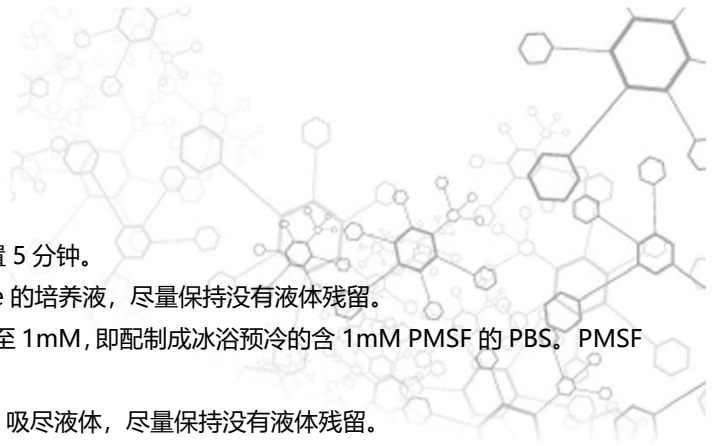
| 货号 | 名称 | 规格 |
|-----------|--------------------------------------|-------|
| P0233 | Protein A+G Agarose/Salmon Sperm DNA | 3*1ml |
| CP0581-1 | Glycine Solution (10X) | 30ml |
| CP0581-2 | ChIP Dilution Buffer | 48ml |
| CP0581-3 | Low Salt Immune Complex Wash Buffer | 24ml |
| CP0581-4 | High Salt Immune Complex Wash Buffer | 24ml |
| CP0581-5 | LiCl Immune Complex Wash Buffer | 24ml |
| CP0581-6 | TE Buffer | 48ml |
| CP0581-7 | 0.5M EDTA | 250μl |
| CP0581-8 | 5M NaCl | 500μl |
| CP0581-9 | 1M Tris, pH 6.5 | 500μl |
| CP0581-10 | SDS Lysis Buffer | 10ml |
| CP0581-11 | Control Primers (5μM each) | 0.1ml |

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 270ul37%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. 4°C, 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。65°C 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 4°C, 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 4°C, 12000g 左右离心 5min。吸取上清至另一离心管中。

说明: 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 4°C, 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。剩余样品加入 70ul Protein A+G Agarose/Salmon Sperm DNA, 在 4°C 缓慢转动或摆动混匀 30min。此步骤的目的是减少 Protein A+G Agarose/Salmon Sperm DNA 和目的蛋白或目的 DNA 序列的非特异性结合。



5. 4°C, 1000g 左右离心 1min, 将上清转移至一个新的 2ml 离心管中。
6. 加入适量一抗, 一抗的用量可参考抗体说明书。如果抗体的说明中未给出用于 ChIP 的稀释比例, 可以参考普通的免疫沉淀的稀释比例。通常一抗的用量为 0.5-1ug。4°C 缓慢转动或摆动混匀过夜。可以不加抗体作为阴性对照, 或用无关的抗体作为阴性对照, 同时可以用没有细胞样品的溶液作为空白对照。
7. 加入 60ul Protein A+G Agarose/Salmon Sperm DNA, 在 4°C 缓慢转动或摆动混匀 60min, 以沉淀一抗识别的蛋白或相应的复合物。
8. 4°C, 1000g 左右离心 1min。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 4°C 缓慢转动或摆动洗涤 3-5min, 随后 4°C, 1000g 左右离心 1min。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 8 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. 1000g 左右离心 1min, 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. 1000g 左右离心 1min, 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。对于步骤二 4 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。

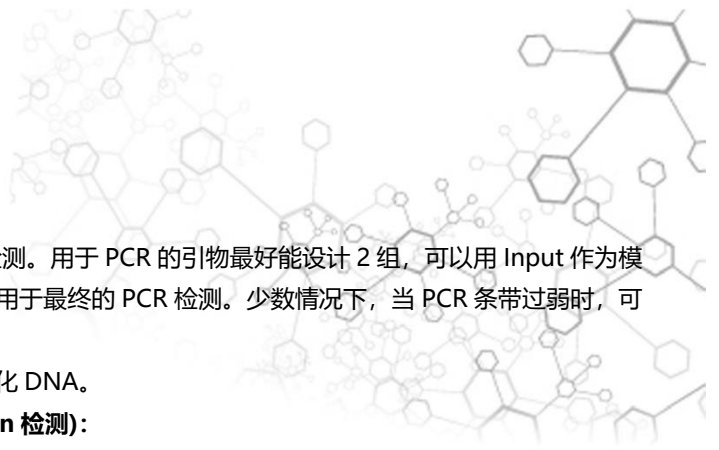
此步骤完成后可以继续后续步骤, 也可先-20°C 冻存, 第二天继续后续步骤。

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, 然后再进行 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, 而 Input 通常不必进行后续纯化步骤。

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 也可以采用适当的 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、请勿冷冻保存 CP0591-1:Protein A+G Agarose/Salmon Sperm DNA。其它溶液可以-20℃ 冷冻以保存更长时间。
- 2、需自备用于 ChIP 的一抗，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)以及细胞刮子或细胞铲子。
- 3、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。
- 4、使用甲醛时请在通风橱中进行操作。
- 5、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。

