

# M5 ChIP Assay Kit ChIP 检测试剂盒 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 ChIP Assay Kit ChIP 检测试剂盒	22T	MF235-01

## 【储存条件】

4°C保存，有效期一年。

## 【产品简介】

ChIP Assay Kit 即 Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit，也称染色质免疫沉淀检测试剂盒或 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。

EMSA，也称 gel shift 获得的结果是体外的(In Vitro)目标蛋白和预期基因组 DNA 片段的结合结果，可以推断细胞内也发生类似的结合，但并不代表该情况在细胞内也真实发生。而 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 Assay Kit 采用了 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。并且提供了预混合的对照引物(Control Primers)和可用于扩增 human GAPDH 的部分相应序列，引物序列为：5'-TACTAGCGTTTTACGGGCG-3'；5'-TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA-3'。本 ChIP Assay Kit 如果用于常规的染色质免疫沉淀，共可以免疫沉淀 22 个样品。

## 【产品组分】

产品编号	产品名称	包装	
MF235-1	Protein A+G Agarose/Salmon Sperm DNA	3ml	务必 4 度保存!!
MF235-2	Glycine Solution (10X)	30ml	
MF235-3	ChIP Dilution Buffer	48ml	
MF235-4	Low Salt Immune Complex Wash Buffer	24ml	
MF235-5	High Salt Immune Complex Wash Buffer	24ml	
MF235-6	LiCl Immune Complex Wash Buffer	24ml	
MF235-7	TE Buffer	48ml	
MF235-8	0.5M EDTA	250μl	
MF235-9	5M NaCl	500μl	
MF235-10	1M Tris, pH 6.5	500μl	
MF235-11	SDS Lysis Buffer	10ml	
MF235-12	Control Primers (5μM each)	0.1ml	

## 【注意事项】

- 1)、请勿冷冻保存 MF235-1 Protein A+G Agarose/Salmon Sperm DNA。除 MF235-1 外，其它溶液可以-20°C冷冻以保存更长时间。
- 2)、需自备用于 ChIP 的一抗，37%甲醛，PBS，PMSF，Elution buffer (1% SDS, 0.1M NaHCO<sub>3</sub>)，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。PMSF，蛋白酶 K，Glycogen 和 3M NaAc pH5.2 等可以自己配置或者向聚合美订购。
- 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。为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 【使用方法】

### 一、样品超声处理条件的优化：

1. 准备适量冰浴预冷的 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 结合的时间点，直接在细胞培养液中加入适量甲醛，轻轻混匀，至最终浓度为 1%。随即在 37°C 孵育 10 分钟，以交联目的蛋白和相应的基因组 DNA。例如，对于常规的每个 10cm 细胞培养皿中加入 10 ml 细胞培养液的情况，需加入 270 微升 37% 甲醛。请注意尽量使用高质量的在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相应调整。
  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。吸尽含甲醛和 glycine 的培养液，尽量保持没有液体残留。
  5. 在上述室温放置 5 分钟期间，用冰浴预冷的 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 30 分钟。
  6. 加入 5-10ml 冰浴预冷的含 1mM PMSF 的 PBS，洗涤细胞，吸尽液体，尽量保持没有液体残留。
  7. 再加入 5-10ml 含冰浴预冷的 1mM PMSF 的 PBS，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 冰浴预冷的含 1mM PMSF 的 PBS，用细胞刮子刮下细胞，收集至离心管中。如果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，以充分沉淀细胞。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。上一步骤的 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，如果能把大部分控制在 400-800bp 则更佳。超声过程中请一定要注意要保持样品处于冰浴中，并且处于较低温度。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以设置为 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，然后摸索不同的超声次数。直至找到比较合适的超声次数可以使大部分基因组 DNA 断裂成 200-1000bp 大小。需要注意的是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。
  13. 在 0.2ml 经过超声处理的样品中加入 8 微升 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 5 分钟。吸取上清至另一离心管中。
- 说明：上述步骤酚氯仿抽提可以使用 DNA 纯化试剂盒进行操作。例如聚合美的 PCR/DNA 纯化试剂盒(MF030)。
- 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 5-10 微升，对于 DNA 纯化试剂盒纯化产物可以取 2-5 微升，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上述超声处理优化步骤 1-11 进行操作，并参考步骤 12 进行超声处理。
2. 随后对于经过超声处理的样品在 4°C，12000-14000g 离心 5 分钟。取上清(约 0.2ml)至一 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 2 毫升。
4. 取出 20 微升样品作为 Input 用于后续检测。其余近 2ml 样品加入 70 微升 Protein A+G Agarose/Salmon Sperm DNA(其中约 35 微升为沉淀，35 微升为液体)，在 4°C 缓慢转动或摆动混匀 30 分钟。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 1 分钟, 将上清转移至一个新的 2 毫升离心管中。
6. 加入适量一抗, 一抗的用量可以参考抗体的说明书。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 0.5-1 微克。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 60 微升 Protein A+G Agarose/Salmon Sperm DNA (其中约 30 微升为沉淀, 30 微升为液体), 在 4°C 缓慢转动或摆动混匀 60 分钟, 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 1 分钟。非常小心地去除液体, 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 3-5 分钟, 随后 4°C, 1000g 左右离心 1 分钟。非常小心地去除液体, 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。

说明: 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(如果 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 NaHCO<sub>3</sub>)。
2. 完成步骤二第 8 小步后, 即完成所有洗涤步骤后, 加入 250 微升 Elution buffer。Vortex 混匀, 室温转动或摆动继续洗脱 3-5 分钟。
3. 1000g 左右离心 1 分钟, 将上清转移到一新的离心管中。沉淀中再加入 250 微升 Elution buffer。Vortex 混匀, 室温转动或摆动继续洗脱 3-5 分钟。
4. 1000g 左右离心 1 分钟, 取出上清。和上一步骤, 即步骤 3C 中获得的上清合并。共计约 500 微升上清。
5. 在 500 微升上清中加入 20 微升 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。对于步骤二第 4 小步获得的作为 Input 的 20 微升样品, 加入 1 微升 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, 也可以先 -20°C 冻存, 第二天继续后续步骤。

**说明:** 此时的样品已经可以用于 PCR, 可以尝试使用 1、2、5 或 10 微升样品作为模板用于 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。

**注意:** 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 520 微升样品中加入 10 微升 0.5M EDTA, 20 微升 1M Tris pH 6.5 和 1 微升 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 20 微克 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 10 分钟, 小心吸去大部分上清, 切勿接触沉淀。
12. 4°C, 12000-14000g 离心 1 分钟, 非常小心地吸除残留液体。

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。

**说明：**步骤三中从小步 7 至 13 也可以采用适当的 DNA 纯化试剂盒纯化 DNA，例如聚合美的 PCR/DNA 纯化试剂盒(MF030)。

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

1. 接步骤二第 8 小步，在完成所有的洗涤步骤后，加入 25 微升 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。
- B. 可以取 10-20 微升用于 Western 检测。



**【备注】**

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。