# ChIP 阳性试剂盒说明书

**产品货号：** KT101-02
**产品简介：** ChIP 技术（Chromatin Immunoprecipitation Assay，染色质免疫沉淀），是研究细胞核内 DNA 与蛋白结合情况的技术，运用针对目标蛋白的抗体把相应的 DNA 蛋白复合物沉淀下来，经过分离纯化就可以对结合在复合物上的 DNA 进行分析。本产品适用于大部分的动物细胞和组织。
本试剂盒包含 12 个 IP 反应。

## 试剂盒包装组分：

表 1 试剂盒包装组分信息

| 4℃保存试剂 | | |
|---|---|---|
| **试剂** | **编号** | **数量** |
| Cell lysis buffer | SCD-1 | 25mL |
| ChIP buffer | SCD-2 | 30ml |
| Elution buffer | SCD-3 | 5ml |
| 5M NaCl | SCD-4 | 100ul |
| MNase digestion buffer | SCD-5 | 3ml |
| Low salt buffer | SCD-6 | 15ml |
| High salt buffer | SCD-7 | 15ml |
| LiCl buffer | SCD-8 | 15ml |
| TE buffer | SCD-9 | 15ml |
| proteinA/G 磁珠 | SCD-10 | 400ul |
| -20℃保存试剂 | | |
| 蛋白酶抑制剂 | SCD-11 | 150uL |
| PMSF | SCD-12 | 150uL |
| ProteinaseK | SCD-13 | 100uL |
| MNase | SCD-14 | 15uL |
| 阳性对照体系：（-20℃保存） | | |
| 阴性对照抗体 IgG | SCD-15 | 35uL |
| 阳性对照组抗体 H3K27ac | SCD-16 | 35uL |
| 阳性检测引物 | SCD-17 | 100uL(10uM) |

## 需要的额外材料：

ChIP 级别抗体
旋转仪

**阳性对照体系说明：**
阴阳性对照组抗体（包含阳性对照抗体 H3K27ac，35uL，阴性对照抗体 IgG,35uL），-20℃储存

阳性 q-pcr 检测引物 GAPDH promoter（人）：
FOR: 5’-TACTAGCGGTTTTACGGGCG-3’
REV: 5’-TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA-3’

**注意事项：**

1 控制好交联时间，细胞一般交联 10min，组织或细菌一般交联 30min。
2 操作过程中不要剧烈吹打磁珠，控制孵育时间和清洗条件
3 用酚氯仿抽提 DNA 过程中，要小心吸取上清，避免吸到下层有机相
4 乙醇沉淀 DNA 后要小心移除上清，防止 DNA 丢失

## 实验过程摘要：

如图 1 所示，细胞或组织用甲醛固定后进行裂解，染色质经超声处理被碎裂成 200-1000 bp 的染色质片段。使用经 ChIP 验证的抗体和 ChIP-Grade ProteinA/G 磁珠进行染色质免疫沉淀。随后将蛋白质-DNA 解交联，苯酚/氯仿提取和乙醇沉淀 DNA。免疫沉淀期间，特定 DNA 序列的富集可使用标准 PCR、定量实时 PCR、芯片 ChIP 扩增、测序或克隆技术等各种方法进行分析。

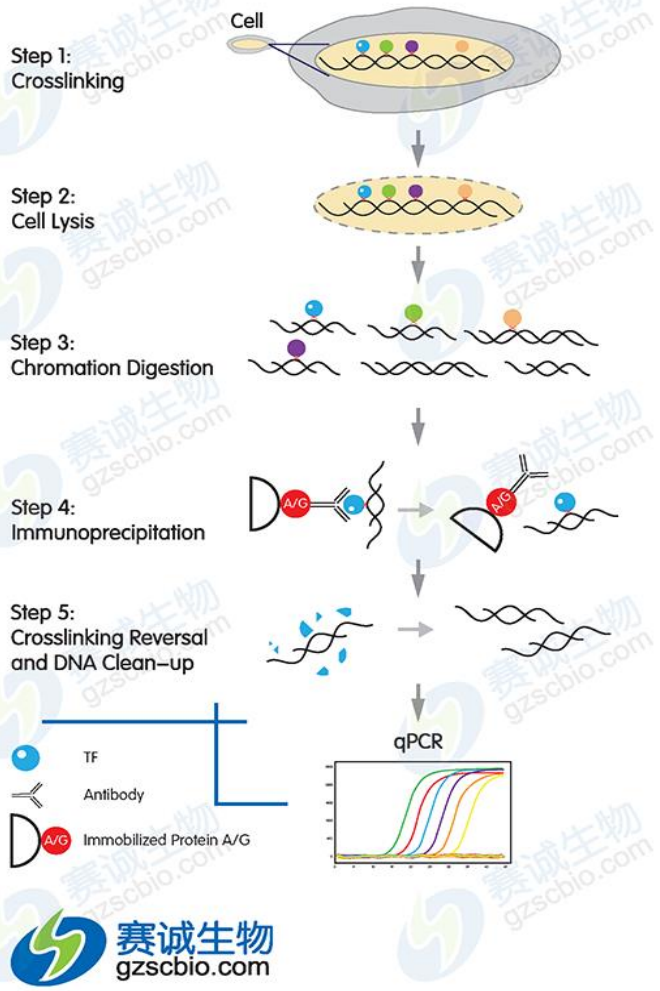



图 1 ChIP 试剂盒实验过程示意图

## 实验步骤

**A、细胞交联**

细胞量：约 3-4x$10^6$个

1.准备约 3-4x$10^6$个贴壁细胞，如果是细胞悬液，细胞密度不要少于 0.5x$10^6$个/ml；

2.于细胞培养基中加入甲醛至其终浓度为 1%，轻轻晃动，使液体均匀，于通风厨中室温孵育 10min。如果是悬浮细胞，需旋转交联，防止细胞聚团；（交联时间一般为 10min，可根据细胞类型调节，交联时间过长，染色质不容易打断，交联时间过短，染色质容易打碎）

3.加入 1/10 体积的 10x 甘氨酸终止液（10x 甘氨酸终止液为 1.25M 甘氨酸）到交联体系中摇匀，于通风厨中室温孵育 5min，终止交联反应；

4.吸出培养皿中混合培养基。用 2-3ml 预冷的 PBS 清洗细胞 3 次；

5.将培养皿放在冰上，加入 1ml 预冷 PBS（每 1ml PBS 加入 12μl PMSF，10μl 蛋白酶抑制剂），用细胞刮刮下细胞（或用 1%胰酶消化，胰酶消化需用 PBS 清洗细胞 2-3 次），将细胞悬浮液转移到 2mL 的微管离心管中；

6.再用 1ml 预冷 PBS，将培养皿洗一遍，把残留的细胞洗下，移至前面的 EP 管中合并，所有刮下的细胞，4℃ 3000rpm 离心 5min，弃除 PBS 上清，将细胞沉淀物保存于-80° C，或者直接进行一下步骤。

**B、裂解细胞（去除细胞质成分）**

1.准备好上述交联好的细胞。如果是冻存的，需在冰上解冻；

2.加 1-1.5 ml cell lysis buffer 重悬细胞沉淀，置于冰上裂解 10min；（破坏细胞膜）

3.4° C ，3000rpm 离心 5min，去上清。再加入 500ul cell lysis buffer 重悬沉淀，然后 3000 rpm 4℃离心 2.5min，去上清；

**C、染色体断裂**

**酶解法：**

1.加入预冷的 250ul MNase digestion buffer(20 mM Tris-HCl, pH7.5, 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 1 mM CaCl2)，每 250ul MNase digestion buffer 用于 3-4x$10^6$个细胞；

2.用枪头轻轻重悬沉淀（消化 buffer 里面没有洗涤剂，细胞重悬起来会比较黏，因此我们要慢慢吹打混匀细胞沉淀）；

3.用 MNase digestion buffer 稀释 MNase (NEB, M0247S, 2000 gel units/ul)至原浓度的 1/10；

4.将 10ul 稀释的 MNase 加入离心管样本中混匀，37℃，1000rpm 旋转孵育 15min（根据染色体片段化效果适当延长或缩短酶解时间，染色体片段在 100-1000bp 为宜）。在这一过程中，约 90%的染色质被消化成单一核小体。（如果细胞浓度较高，可适当加多 10x 稀释的 MNase）。孵育完成后，样本放 4℃保存备用；

5.检测染色质断裂情况：

取 10ul 样本，加入 90ul Elution buffer。65℃孵育 2h，加入 2ul 蛋白酶 K，孵育 1h。酚氯仿或 DNA 纯化试剂盒提取 DNA，2%凝胶电泳检测打断结果。

**打断的 DNA 片段长度在 100-1000 的范围，最好在 100-500 之间。**

**注：不同细胞类型染色体断裂的程度会有所差别，可能需要根据断裂情况适当减少或增加酶解时间和酶的用量。**

**D、抗体孵育**

1.按下表配制样品体系

表 2 每个 IP 管中加入

| 试剂 | 用量 |
|---|---|
| 断裂染色质 | 100ul |
| ChIP buffer | 900ul |
| 总体积 | 1ml |

2. 每组断裂染色质样本取 10%放入新的离心管中，即 10ul 作为 Input 于-20℃保存；
3. 向每个 IP 管中加入阴性抗体 IgG(5uL,5ug)或阳性抗体 H3K27ac(阳性抗体 5uL,5ug)。4℃旋转孵育过夜；

**E、磁珠的准备**

1. 标记实验所需的 1.5ml EP 管，包括阳性抗体 H3K27ac 组，阴性对照抗体 IgG 组；
2. 上下颠倒重悬磁珠，吸取 30uL 磁珠悬液于每个 1.5mL EP 管中，瞬时离心，去上清；
3. 每管加入 500uL ChIP Buffer，轻微上下颠倒混匀清洗磁珠；
4. 3000rpm 离心 1 min，去上清，放冰上备用；

**F、磁珠孵育**

1. 向清洗后的磁珠中加入过夜孵育的抗体-染色质复合物，4℃旋转孵育 4-6h；
2. 3000rpm 离心 1min，去掉上清；

**G、清洗**

1. 加入 1ml ChIP Buffer 清洗 beads，4° C 翻转 5min， 4° C 3000rpm 2min，去上清；
2. 加入 1ml Low salt buffer 清洗磁珠，4° C 翻转 5min， 4° C 3000rpm 2min，去上清；
3. 加入 1ml High salt buffer 清洗磁珠，4° C 翻转 5min， 4° C 3000rpm 2min，去上清；
4. 加入 1ml LiCl buffer 清洗磁珠，4° C 翻转 5min， 4° C 3000rpm 2min，去上清；
5. 加入 1ml TE buffer 清洗磁珠，上下轻微颠倒混匀， 4° C 3000rpm 2min，去上清；

**H、DNA 纯化**

1. 从-20℃取出 input(冰上缓慢解冻),以及 IP 组,每组中分别加入 120ul Elution buffer，室温旋转孵育 30min；
2. 加入 5ul 5M NaCl，65℃孵育 2h；
3. 加入 2ul 蛋白酶 K，60℃孵育 1h；
4. 3000rpm 离心 1min，转移上清到新的离心管中；
5. 酚氯仿或 DNA 纯化试剂盒纯化 DNA。获得的 DNA 可进行 q-pcr 检测和高通量测序。

**酚氯仿抽提 DNA 方法：**（饱和酚：氯仿：异丙醇=25:24:1）

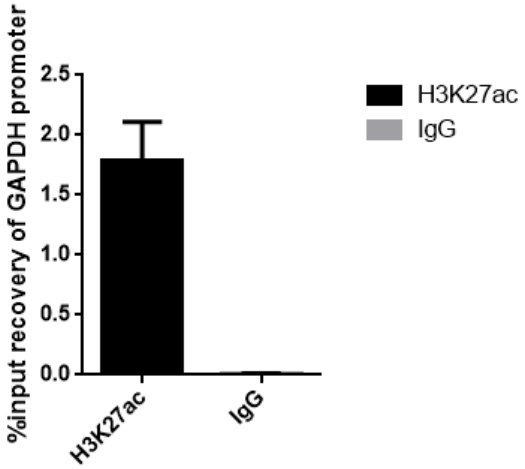
为了减少 DNA 产物损失，可以在蛋白酶 K 消化完之后再补充加入 200uL Elution buffer 之后再离心转移上清到新离心管中。

1. 上清中加入等体积的酚氯仿抽提混合液，涡旋振荡 10s 混匀，然后静置 5min，再 1,2000rpm 离心 15min。
2. 离心后小心吸取上层水相至新的离心管中，加入 2.5 倍体积的无水乙醇混匀，放在-20 摄氏度过夜沉淀 DNA。
3. 第二天 1,2000rpm 离心 15min 后小心去除上清，再用 75%乙醇重复洗沉淀 3 次，尽量完全去除上清，开盖晾干（约 3min），加入 15 至 20uL 水溶解产物。

**DNA 纯化试剂盒纯化 DNA:**按其试剂盒说明书操作。

## 阳性体系 Q-PCR 检测：

阳性：QPCR 检测蛋白 H3K27ac 对 GAPDH promoter 的富集，
阴性：QPCR 检测蛋白 IgG 对 GAPDH promoter 的富集，




## 问题解决方案：

| 问题 | 解决方案 |
|---|---|
| 染色质打不断 | 交联时间过长 |
| | 超声时间太短 |
| 染色质消失 | 交联时间过短 |
| | 酶解时间太长，染色质打太碎 |
| | 蛋白酶 K 失效，DNA 无法与蛋白分离 |
| DNA 获取量低 | 被检测蛋白表达量较少，可适当增加细胞量 |
| | 交联时间过短，蛋白从 DNA 上滑落 |
| | 去掉高盐 buffer 换为两次低盐 buffer 洗涤 |
| | 检查抗体是否是 ChIP 级别的 |
| 结果差异较小（假阳性太多） | 增加细胞量与磁珠抗体的比率。 |
| | 增加高盐洗涤次数 |
| | 检查抗体是否是 ChIP 级别的 |