



染色质免疫共沉淀 (ChIP) 试剂盒

产品货号	产品名称	包装
DW1151	染色质免疫共沉淀 (ChIP) 试剂盒	24T

产品介绍:

染色质免疫共沉淀 (ChIP) 试剂盒, 包含足够完成 24 个反应的试剂, 每个反应用 40 μ L 树脂。由于每次 ChIP 需要设置实验组和对照组, 因此本试剂盒可以完成 12 次 ChIP 实验。

试剂盒组分:

编号	试剂名称	体积 (24 Tests)	储存条件
①	Protein G 树脂	1 mL	4°C, 1年
②	裂解缓冲液	10 mL	4°C, 1年
③	漂洗液	50 mL	4°C, 1年
④	洗脱缓冲液	1.2 mL	4°C, 1年
⑤	10xTE 缓冲液	100 μ L	4 °C, 1年
⑥	NaCl	500 μ L	4 °C, 1年
⑦	蛋白酶抑制剂	340 μ L	-20°C, 1年
⑧	RNase A	200 μ L	-20°C, 1年
⑨	Proteinase K	200 μ L	-20°C, 1年
⑩	10 mL 离心管	—	—

I 产品简介

染色质免疫共沉淀 (ChIP) 是研究体内 DNA 与蛋白结合的技术。先用甲醛交联细胞内的“蛋白-DNA”复合物, 裂解细胞后, 用超声波破碎 DNA 至适合的长度, 采用特异性抗体捕获细胞内的诱饵蛋白及其结合的

DNA 片段，再加入 protein G 树脂沉淀“抗体-诱饵蛋白-结合 DNA”复合物，随后将蛋白与 DNA 解交联，提取结合的 DNA。该 DNA 可用于后续的定量 PCR 检测 (qPCR) 或高通量测序 (seq)。

II 重要产品信息

- 请勿干燥、冷冻或剧烈涡旋树脂，这些操作会导致树脂聚集而降低结合能力。
- 由于煮沸会导致树脂聚集并且失去结合能力，经煮沸的树脂不应再次使用。
- 本试剂盒采用抗体与抗原双洗脱的方式，因此在诱饵蛋白的 western-blot 检测结果中，至少存在 3 个条带：抗体的重链 (50 kDa)，抗体的轻链 (25 kDa) 和诱饵蛋白。
- 裂解缓冲液可兼容 BCA 蛋白定量。

III 额外所需的主要试剂和仪器

- 自备试剂：诱饵蛋白的 ChIP 级别抗体、Normal IgG、PBS、甲醛、甘氨酸、无水乙醇、80%乙醇、苯酚、氯仿、异戊醇、ddH₂O。
- 所需仪器：混匀仪、超声破碎仪、低温离心机。

IV 操作流程

*注意：

- 请在吸取树脂前，将移液枪枪头尖部剪掉 1~2mm。
- 为保证树脂均匀分布，请通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀瓶中树脂。
- 具体样品量和孵育时间依赖于每个特定体系，可能需要优化才能得到最大产量。

4.1 细胞交联

- (1) 每组取 2×10^7 个细胞，预冷的 $1 \times$ PBS 漂洗 2~3 次，彻底去除培养基成分，4°C 1000 g 离心 5 min 收集沉淀。
- (2) 加入 10 mL $1 \times$ PBS (含 270 μ 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 °C 1000 g 离心 5 min 收集细胞，弃上清。



(5) 加 10 mL 预冷的 1×PBS 漂洗细胞 2~3 次，彻底去除交联剂成分，4°C 1000 g 离心 5 min 收集细胞沉淀，液氮速冻 3 min，-80 °C 保存。

4.2 细胞裂解及染色质超声打断

- (1) 向细胞中加入 300 μL ②裂解缓冲液、3 μL ⑦蛋白酶抑制剂（按 1:100 添加），吹打混匀。
- (2) 非接触式全自动超声波破碎仪，高功率，30 s + 30 s 冰上超声 28 轮，或接触式超声仪 35% 功率，2 s + 5 s 冰上超声破碎细胞 15 min。
- (3) 4°C 13000 g 离心 10 min，取上清至新的离心管中；取 30 μL 样本作为 input，剩余用于 ChIP 实验，-80 °C 保存。
- (4) 取 5 μL DNA 解交联（见步骤 4.5），并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。

* 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。

4.3 漂洗液准备

取出 ⑩ 10 mL 离心管（空管），加入本次实验 2 组样本（实验组+对照组）所需的 4 mL ③漂洗液和 20 μL ⑦蛋白酶抑制剂（按 1:200 添加），混合均匀，冰上保存，现配现用。

* 注意：如果有多组样本，按照实际使用量配置。

4.4 染色质免疫共沉淀 (ChIP)

- (1) 向样本裂解液（4.2 制备）中加入适量抗体（按照抗体说明书添加），放混匀仪上室温孵育 1~2 h 或 4 °C 过夜。

-
- (2) 每组实验取40 μL ①树脂，加入200 μL 漂洗液（4.3 配置），颠倒混匀30次，500 g 离心5 min，弃上清。
 - (3) 再次加入200 μL 漂洗液（4.3 配置），颠倒混匀30次，500 g 离心5 min，弃上清，保留树脂。
 - (4) 向树脂中加入步骤（1）的样本/抗体混合物，放混匀仪上4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h。
 - (5) 4 $^{\circ}\text{C}$ 500 g 离心5 min，弃上清。
 - (6) 加入500 μL 漂洗液（4.3 配置），颠倒混匀30次，4 $^{\circ}\text{C}$ 500 g 离心5 min，弃上清；重复该漂洗操作1次。
 - (7) 再次加入500 μL 漂洗液（4.3 配置），颠倒混匀30次，之后取100 μL 移入新的离心管中用于蛋白检测（标注为管1），剩余400 μL 用于DNA提取（标注为管2）；两管分别4 $^{\circ}\text{C}$ 500 g 离心5 min，弃上清。
 - (8) 向管1 中加入20 μL 2 \times 上样缓冲液（125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20%甘油, 0.004%溴酚蓝）并煮沸3 min, 12000 g 离心30 s, 收集上清至新的离心管中，用于诱饵蛋白的Western-Blot 检测。
 - (9) 向管2 中加入40 μL ④洗脱缓冲液，涡旋震荡20s，放混匀仪上室温洗脱10 min，涡旋震荡20s；4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 g 离心5 min，收集上清至新的离心管中。

4.5 解交联

- (1) Input 组、IP 组样品分别加入356.4 μL ddH₂O、3.6 μL ⑤10 \times TE 缓冲液，65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育6 h 或者过夜。
- (2) 每管加入8 μL ⑧RNase A，颠倒混匀10~15次，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育0.5~2 h。
- (3) 每管加入8 μL ⑨Proteinase K，55 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h。

4.6 沉淀DNA

- (1) 每管加入400 μL 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 μL 5 M ⑥NaCl 和1 mL 无水乙醇，-20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀2 h 或过夜，4 $^{\circ}\text{C}$ 16000 g 离心30 min，去上清。
- (3) 加入500 μL 80%乙醇洗涤沉淀，4 $^{\circ}\text{C}$ 16000 g 离心30 min，去上清，开盖晾干乙醇。
- (4) 加入20 μL ddH₂O，溶解沉淀DNA。

注意事项：



多沃生物

Dowobio Biotechnology Co., Ltd



- 1.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。
- 2.为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

本产品文章中的写法：

英文：Dowobio (Shanghai, China)

中文：上海多沃生物科技有限公司 Dowobio, 上海

上海多沃生物