



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	20T

产品介绍:

染色质免疫共沉淀 (ChIP) 试剂盒, 包含足够完成 20 个反应的试剂。

试剂盒组分:

产品编号	产品名称	包装	保存温度
DW1151-A	Cell lysis buffer	25ml	4°C, 一年
DW1151-B	Low salt wash buffer	80ml	4°C, 一年
DW1151-C	High salt wash buffer	25ml	4°C, 一年
DW1151-D	Protein A/G 磁珠	1ml	4°C, 一年
DW1151-E	LiCl wash buffer	25ml	4°C, 一年
DW1151-F	Elution buffer	1ml	4°C, 一年
DW1151-G	5 M NaCl	500ul	4°C, 一年
DW1151-H	Proteinase K	100ul	-20°C, 一年
DW1151-I	RNase A	100ul	-20°C, 一年
DW1151-J	0.1 MTT	200ul	-20°C, 一年
DW1151-K	10 x Glycine solution	50ml	4°C, 一年

自备产品:

甲醛溶液 (推荐 CST)、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、DNA 纯化试剂盒

样品准备:

1. 细胞数量:

建议使用 $1-5 \times 10^7$ 个细胞进行 ChIP 实验。细胞数量过少可能导致 DNA 浓度不足，影响后续实验。

2. 甲醛交联:

- (1) 配制 1% 甲醛溶液: 将 20 ml 无血清培养基与甲醛溶液摇匀, 使甲醛的终浓度为 1%。
- (2) 弃去细胞培养基, 用 PBS 洗涤细胞 2 次。
- (3) 加入 18ml 1% 甲醛溶液, 室温孵育 2-10 分钟。注: 交联时间根据实验需求和样本调整, 通常 2-10 分钟足够。交联时间过长可能导致 DNA 片段过大, 影响后续超声处理。

3. 终止交联:

- (1) 加入 2 ml 10 x 甘氨酸溶液, 摇匀, 室温反应 5 分钟, 终止交联反应。
- (2) 弃去上清液, 加入 10 ml 预冷的 PBS, 洗涤细胞 2 次, 去除残留的甲醛和甘氨酸。

4. 细胞收集:

- (1) 加入 10 ml 预冷的 PBS, 用细胞刮将细胞刮下, 并转移至 15 ml 离心管中。
- (2) 1000 X g, 4 度, 离心 5 分钟, 弃去上清液。

细胞裂解:

细胞加入 1ml Cell lysis buffer (DW1151-A), 【注】使用前加入适量蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂, 充分混匀, 冰上反应 10 分钟。

超声处理:

1. 使用超声仪将 DNA 打断成 200 -1000 bp 的片段。【注】超声条件需要根据细胞类型和超声仪型号进行优化。
2. 推荐条件: 使用 3mm 探头, 设置跟大超声功率约 300W, 每次超声 20 秒, 休息 40 秒, 重复 10-20 次。注意: 避免样品过热, 超声过程中不要产生气泡, 建议用间接超声仪, 在冰里面操作。
3. 超声后, 8000 x g, 4 度, 离心 10 分钟, 收集上清液, 即获得交联染色质制备物, 可置于 - 80 C 保存。
4. 取出 50 μ L 已超声的样品检测 DNA 的浓度及片段大小。【注】可根据 DNA 的片段大小调整超声时间。

检测 DNA 浓度及片段大小

1. 取出 50 μ L 超声后的样品, 加入 4.8 μ L 5 M NaCl (DW1151-G) 和 2 μ L RNase A (DW1151-I), 65 C 反应 2 小时。
2. 加入 2 ul Proteinase K (DW1151-H), 60 度反应 1 小时。



3. 使用 DNA 纯化试剂盒或酚氯仿法纯化 DNA。
4. 将 DNA 稀释 50 倍，检测 OD260 值，计算 DNA 浓度($\mu\text{g/ml} = \text{OD}260 \times 2500$)。理想 DNA 浓度应在 50-200 $\mu\text{g/ml}$ 。
5. 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 片段大小，确保 DNA 片段在 200-1000 bp 之间。

Chromatin IP

【注】Cell lysis buffer 在使用前已加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂。 1. 按照下表配制 Chromatin IP Mix:

1. 按照下表配制 Chromatin IP Mix:

试剂名称	体积 (ul)	终浓度
Cell lysis buffer(DW1151-A)	0- 300	体积为 495ul-交联染色质提交体积
0.1 MTT(DW1151-J)	5	1 μM
交联染色质制备物	200- 500	
合计	500ul	

【注】应设置阴性对照和阳性对照。同时取出 10 μL 交联染色质制备物作为 Input。

2. 抗体孵育:

在 Chromatin IP Mix 中加入 IP 级抗体，混匀，4 $^{\circ}\text{C}$ 旋转孵育 4 小时以上或过夜。【注】抗体使用通常为 2-5 μg ,具体用量参考抗体生产商的推荐。

3. 磁珠处理:

(1)将 Protein A/G Magnetic Beads (DW1151-D) 重悬，取 50 μL 至新的离心管中。

(2)将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。

(3)加入 100 μL Cell lysis buffer(DW1151-A)，重悬磁珠，置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。

重复洗涤一次。

4.免疫沉淀:

将 Chromatin IP Mix 加入含有磁珠的离心管中，4 $^{\circ}\text{C}$ 旋转孵育 2 小时。

4. 洗涤步骤:

- (1)将离心管置于磁力架上, 收集磁珠并弃掉上清液。
- (2)加入 1 ml Low Salt Wash Buffer (DW1151-B), 温和重悬磁珠, 4°C 旋转孵育 5 分钟。
- (3)重复洗涤 2-3 次。
- (4)加入 1 ml High Salt Wash Buffer (DW1151-C), 温和重悬磁珠, 4°C 旋转孵育 5 分钟。
- (5)加入 1 ml LiCl Wash Buffer (DW1151-E), 温和重悬磁珠, 置于磁力架上, 收集磁珠。

6. 洗脱:

- (1)加入 100 μ L Elution Buffer (DW1151-F), 涡旋, 65°C 孵育 30 分钟。
- (2)将离心管置于磁力架上, 收集上清液至新的离心管中。

7. DNA 纯化:

- (1)向每个反应 (包括 Input)中加入 6 μ L 5 M NaCl (DW1151-G) 和 2 μ L Proteinase K (DW1151-H), 65°C 反应 2 小时。
- (2)使用 DNA 纯化试剂盒或酚氯仿法纯化 DNA。

注意事项:

- 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