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℃，一年
DW1151-B	Low salt wash buffer	80ml	4℃，一年
DW1151-C	High salt wash buffer	25ml	4℃，一年
DW1151-D	Protein A/G 磁珠	1ml	4℃，一年
DW1151-E	LiCl wash buffer	25ml	4℃，一年
DW1151-F	Elution buffer	1ml*2	4℃，一年
DW1151-G	5 M NaCl	500ul	-20℃，一年
DW1151-H	Proteinase K	100ul	-20℃，一年
DW1151-I	RNase A	100ul	-20℃，一年
DW1151-J	0.1 MTT	200ul	-20℃，一年
DW1151-K	10 x Glycine solution	50ml	4℃，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 1-5×10^7 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 µL 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 µL 超声后的样品， 加入 4.8 µL 5 M NaCl （DW1151-G）和 2 µL 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 0D260 值，计算 DNA 浓度(μg/ml = OD260 x 2500)。 理想 DNA 浓度应在 50-200 μg/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 lP Mix 中加入 IP 级抗体， 混匀， 4°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 Chromati nlPMix 加入含有磁珠的离心管中， 4°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），溫和重悬磁珠，置于磁力架上，收集磁珠。

6. 洗脱：

(1)加入 100 μL 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 μL 5 M NaCl（DW1151-G）和 2 μL 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。

本产品在文章中的写法：
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