



染色质免疫共沉淀 (ChIP) 试剂盒

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 实验准备及注意事项.....	1
3. 操作步骤.....	3
4. 问题以及解决方案.....	4
5. 订购信息及相关产品.....	4
6. 附录.....	5

1. 产品介绍

染色质免疫共沉淀试剂盒, 也称 ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) 试剂盒, 是 ChIP 相关实验流程中最重要的一环。ChIP 是在活细胞状态下, 通过甲醛固定使蛋白质与 DNA 形成复合物, 并通过超声的方法将其随机切断成一定长度范围内的染色质小片段, 然后再通过抗原抗体特异性结合反应, 富集与目的蛋白结合的 DNA 片段, 解交联后分离、纯化 DNA, 获取的 DNA 经检测分析, 从而获得蛋白质与 DNA 相互作用的信息。

该试剂盒包含含 Box A、Box B 和 Box C, 可进行 24 次独立的染色质免疫沉淀 (ChIP) 反应。经验证, 试剂盒中提供的 rProtein A/G MagPoly Beads, 能更好的免疫沉淀染色质。在蛋白质-DNA 解交联后, DNA 使用离心柱法进行纯化, 方便快捷, 无需进行苯酚/氯仿提取和乙醇沉淀。目的 DNA 序列的富集可通过标准 PCR、qPCR 或测序等各种方法进行分析。

表 1. Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Kit 产品组分

产品序号	产品名称	规格(8T)	规格(24T)	保存温度
1	rProteinA/G MagPoly Beads	0.3ml	1ml	
2	Glycine Solution (2.5M)	8ml	12.5 ml×2	
3	ChIP Sonication Buffer	8ml	25ml	
Box A	ChIP Buffer	3ml	10ml	2-8°C
5	High Salt and Lysis Buffer	17.5 ml×2	100ml	
6	Low Salt Buffer	20ml	60ml	
7	TE Buffer	8ml	25ml	
8	DNA BL Buffer	5ml	15ml	
9	DNA Binding Buffer	5ml	15ml	
10	DNA Wash Buffer	15ml	40ml	
Box B	DNA Elution Buffer	1ml	1ml	RT
12	RNase free ddH ₂ O	1ml	1ml	
13	离心柱	10	30	
14	收集管	10	30	
15	Proteinase inhibitors (100×)	0.3ml	1ml	
Box C	Proteinase K(10mg/mL)	70ul	200ul	-20°C
17	RNase (10mg/mL)	70ul	200ul	

2. 实验准备及注意事项

2.1 试剂的准备

- 1×PBS
- 37%甲醛 (分子级别)
- 1.5%琼脂糖凝胶
- ChIP 级目的抗体
- 与目的抗体同种属 IgG 对照抗体
- 用于 PCR 或 qPCR 检测试剂盒

2.2 设备及耗材的准备

- 磁力架
- 超声波细胞破碎仪



涡旋振荡器
微量离心机
水浴锅
计时器
可变容量移液器 (10 μ l-1000 μ l) +相关吸头
1.5ml 无 RNase 微量离心管
15ml 无 RNase 离心管
PCR 仪
PCR 管

2.3 注意事项

- 1) 试剂盒采用冰袋运输, 收货后, 取出 Box A 置于 2-8 $^{\circ}$ C, Box B 置于室温, Box C 置于-20 $^{\circ}$ C 保存, 避免阳光直射。
- 2) Protease inhibitors 为一种细胞毒性化学物质, 建议在通风橱或经认证的生物实验台中使用, 且注意避光保存。

3.操作步骤

3.1 样品制备与交联

3.1.1 实验前准备

- 1) 用 PBS 配制 37% 甲醛, 现配现用, 室温放置;
 - 2) 提前解冻 Protease inhibitors(100 \times)至室温;
 - 3) 对于悬浮细胞, 每 20ml 培养液配制 40ml 1 \times PBS, 冰浴;
 - 4) 对于贴壁细胞, 每 15cm 培养皿配制 40ml 1 \times PBS, 1980 μ l 1 \times PBS+20 μ l Protease inhibitors(100 \times), 全部冰浴;
- 如若立即进行染色质制备, 还需配制 ChIP Sonication Buffer (含 1 \times Protease inhibitors), 每 1 \times 10⁷-1.5 \times 10⁷ 个细胞需要 1ml。

3.1.2 操作步骤

3.1.2.1 悬浮细胞样品

- 1) 添加新鲜配制的 37% 甲醛, 使得甲醛终浓度为 1%, 甲醛加入体积大约为 1/40 细胞培养液体积, 短暂混匀后室温静置 10min 以固定细胞, 细胞密度不高于 5 \times 10⁵/ml, 添加甲醛后培养液颜色发生变化属正常现象;
- 2) 添加 Glycine Solution (2.5M)至上述细胞培养液, 使得 Glycine Solution 终浓度为 1.25mM, Glycine Solution 加入体积大约为 1/20 细胞培养液体积, 稍混匀, 室温下孵育 5min 以解除甲醛交联作用, 添加 Glycine Solution 后培养液颜色发生变化属正常现象;
- 3) 1200rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 3min 弃上清;
- 4) 用 20ml 预冷的 1 \times PBS 重悬细胞两次, 每次 1200rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 3min, 弃上清;
- 5) 收集的细胞可-80 $^{\circ}$ C 冻存三个月或每 1.0 \times 10⁷-1.5 \times 10⁷ 个细胞加入 990 μ l ChIP Sonication Buffer, 10 μ l Protease inhibitors 混匀继续下一步实验。

3.1.2.2 贴壁细胞样品

- 1) 对于 15cm 培养皿 (含 20ml 培养基) 来说, 添加新鲜配制的 37% 甲醛, 使得甲醛终浓度为 1%, 甲醛加入体积大约为 1/40 细胞培养液体积, 短暂混匀后室温静置 10min 以固定细胞, 添加甲醛后培养液颜色发生变化属正常现象;
- 2) 添加 Glycine Solution (2.5M)至上述细胞培养液, 使得 Glycine Solution 终浓度为 1.25mM, Glycine Solution 加入体积大约为 1/20 细胞培养液体积, 稍混匀, 室温下孵育 5min 以解除甲醛交联作用, 添加 Glycine Solution 后培养液颜色发生变化属正常现象;
- 3) 弃培养基, 用 20ml 预冷的 1 \times PBS 清洗细胞, 重复清洗一次;
- 4) 每个培养皿加入 2ml 预冷的含有终浓度 1 \times Protease inhibitors 的 1 \times PBS, 将细胞刮入清洗液, 然后将细胞混合液全部转入 15ml 离心管, 1200rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 3min 弃上清;
- 6) 收集的细胞可-80 $^{\circ}$ C 冻存三个月或每 1.0 \times 10⁷-1.5 \times 10⁷ 个细胞加入 990 μ l ChIP Sonication Buffer, 10 μ l Protease inhibitors 混匀继续下一步实验。

3.2 染色质超声破碎

一次染色质制备规定为 1.0 \times 10⁷-1.5 \times 10⁷ 个细胞, 可以同时进行多份染色质免疫沉淀。超声的细胞数和超声产生的片段大小直接影响免疫沉淀结果。

- 1) 对于一份染色质制备物, 加入如下试剂: 一管冰浴解冻的细胞+990 μ l ChIP Sonication Buffer, 10 μ l Protease inhibitors 混匀, 平均转入 2 个 1.5ml 干净的离心管, 冰浴 10min。
- 2) 将样品置于超声破碎仪中进行染色质超声破碎。

注: a) 超声过程中, 需保持样品一直处于冰浴低温状态, 细胞溶液不超过 10 $^{\circ}$ C。超声探头不能接触管底或管壁, 若超声过程中产生泡沫, 需立刻停止超声, 调整超声管位置。

b) 对于不同的细胞破碎仪, 超声设置可能不同, 需根据预实验或经验来确定, 最佳超声条件可产生小于 1000bp 的染色质大小约 60-90%, 超声不足或超声过度都会影响结果。可设置多个超声时间对比。

- 3) 待细胞溶液变清亮, 将超声后的细胞溶液 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min (离心机提前预冷), 取上清, 即为交联的染色质, 可以多管分装, 额外取 10 μ l 用于检测染色质超声效果及 DNA 浓度测定, 其余-80 $^{\circ}$ C 冻存。

3.3 染色质片段化检测及浓度测定



3.3.1 实验前准备

- 1) 水浴锅设定温度 65℃;
- 2) 从 4℃ 取出 ChIP Buffer, 并 37℃ 水浴至溶液完全变澄清。

3.3.2 操作步骤

- 1) 取 10μl 超声后染色质, 加入 40μl ChIP buffer, 2μl Proteinase K, 2μl RNase 混匀后, 盖上管盖, 封口膜封口离心管, 65℃ 水浴 3.5 h 后取出瞬时离心。按照第 3.6 步离心柱法纯化 DNA, 并检测 DNA 浓度, 获得的 DNA 样本可在 -20℃ 下保存半年;
- 2) 取 DNA 样本 >100ng, 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 通过 DNA 片段大小确认超声效果, 大约 60-90% 的 DNA 片段应小于 1000bp。

3.4 染色质免疫沉淀

3.4.1 实验前准备

- 1) Protease inhibitors(100×)、rProtein A/G MagPoly Beads、High Salt and Lysis Buffer、ChIP 级目的抗体 (根据说明书确定, 每个 ChIP 样品大约需 2-5μg, 可根据预实验摸索最佳抗体量), 与目的抗体同种属 IgG 抗体。
- 2) 可根据第 3.3 步检测的 DNA 浓度来确定这一步需要加入的染色质体积。冰上融化, 每次免疫沉淀, 组蛋白使用含 5-10μg DNA 的超声后染色质, 转录因子使用含 10-20μg DNA 的超声后染色质。

3.4.2 操作步骤

- 1) 根据第 3.3 步检测的 DNA 浓度, 确定每个免疫沉淀反应需要的染色质体积, 在加入 5μl Protease inhibitors (100×) 后, 用 High Salt and Lysis Buffer 稀释至 500μl, 然后每个样品管取 25μl 作为 5% input 对照 (一个样品可只取一管 input), -20℃ 冻存, 不进行免疫沉淀反应, 与其他免疫沉淀后样品同时进行解交联, 进行后续实验。
- 2) 在每个样品管中再加入一定体积的抗体 (大约 2-5μg, 根据抗体使用说明或预实验确认最佳量), 注意要设置阴性和阳性对照, 分别加入阴性对照抗体和阳性对照抗体, 4℃, 振荡孵育大于 5 小时或过夜。
- 3) 每个样品对应取 36μl rProtein A/G MagPoly Beads, 提前用 High Salt and Lysis Buffer 清洗平衡三次, 每次 700μl;
- 4) 将 4℃ 孵育后的样品即蛋白质-抗体复合物转入平衡后的 rProtein A/G MagPoly Beads 混匀, 4℃ 振荡孵育 1h。

3.5 洗脱、解交联

3.5.1 实验前准备

- 1) 4℃ 取出 ChIP Buffer, 并 37℃ 水浴至溶液完全变澄清;
- 2) 水浴锅设定温度 65℃;
- 3) High Salt and Lysis Buffer、Low Salt Buffer 和 TE Buffer 提前冰浴。

3.5.2 操作步骤

- 1) 取出 4℃ 孵育的磁珠, 放入磁力架上静置 1min, 待磁珠完全被吸附后, 弃液体;
- 2) 每个离心管中加入 1ml 冰浴的 High Salt and Lysis Buffer, 上下轻轻颠倒混匀 10 次, 使磁珠完全分散开, 并放回磁力架, 待磁珠完全被吸附后吸弃上清, 重复操作两次;
- 3) 加入 1ml 冰浴的 Low Salt Buffer, 上下轻轻颠倒混匀 10 次, 使磁珠完全分散开, 并放回磁力架, 待磁珠完全被吸附后吸弃上清, 重复操作一次;
- 4) 加入 1ml 冰浴的 TE Buffer, 上下轻轻颠倒混匀 10 次, 使磁珠完全分散开, 并放回磁力架, 待磁珠完全被吸附后吸弃上清;
- 5) 每个磁珠中加入 150μl ChIP buffer, 2μl Proteinase K, 2μl RNase 混匀后, 盖上管盖, 封口膜封口离心管, 65℃ 孵育 4h (期间混匀离心管数次)。样品冷却至室温后放回磁力架, 待磁珠完全被吸附后, 转移上清至干净离心管中, 进行 3.6 步骤纯化 DNA。
- 6) 取出步骤 3.4.2 中 -20℃ 冻存的 25μl input, 加入 125μl ChIP buffer, 2μl Proteinase K, 2μl RNase 混匀后, 盖上管盖, 封口膜封口离心管, 65℃ 孵育 4h (期间混匀离心管数次)。样品冷却至室温后放回磁力架, 待磁珠完全被吸附后, 转移上清至干净离心管中, 进行 3.6 步骤纯化 DNA。

3.6 离心柱法纯化 DNA

3.6.1 实验前准备

DNA Wash Buffer 使用前请按标签提示加入无水乙醇, 并混合均匀;
将离心柱放入收集管, 加入 500μl DNA BL Buffer, 12000rpm 室温离心 1min, 弃收集管中液体, 平衡后的离心柱当天使用。

3.6.2 操作步骤

- 1) 添加 450μl DNA Binding Buffer 到每份样品 (免疫沉淀样品、input 样品) 混匀, 并转移到 DNA 离心柱中, 室温静置 2min, 12000rpm, 室温离心 1min;
- 2) 弃收集管中液体, 离心柱放回收集管, 加入 600μl DNA Wash Buffer, 室温放置 3-5min 后, 12000rpm 室温离心 1min;
- 3) 弃收集管中液体, 离心柱放回收集管, 加入 600μl DNA Wash Buffer, 12000rpm 室温离心 1min;
- 4) 弃收集管中液体, 离心柱放回收集管, 12000rpm 室温离心 2min;
- 5) 将离心柱重新放入一干净的 1.5ml 离心管, 室温静置 2min 后, 在离心柱中心位置加入 40μl DNA Elution Buffer 或 RNase free ddH₂O;
- 6) 室温放置 2min 后, 12000rpm 室温离心 2min, 洗脱 DNA, 1.5ml 离心管收集的液体即为纯化的 DNA (-20℃ 可保存 6 个月)。



3.7 定量检测 DNA

- 1) 使用带滤芯吸头减少实验污染;
- 2) 建议使用热启动 Taq 酶减少非特异性污染;
- 3) 引物设计具有特异性, 遵循标准引物设计规则, 普通 PCR 建议扩增大小 150-200bp, qPCR 建议扩增大小 80-160bp。
- 4) 利用步骤 3.6 提取的免疫沉淀样品 DNA 以及 input DNA, 按照 PCR 检测试剂盒说明书加样, 检测。每个检测孔设置复孔。

3.7.1 普通 PCR 反应 (仅供参考)

表 2. PCR 反应体系如下

试剂	反应体系
10×PCR Buffer	2μl
4mM dNTP	1μl
10uM 引物	1μl
DNA 模板	2μl
Taq DNA 聚合酶	0.5μl
RNase free ddH ₂ O	13.5μl

表 3. PCR 反应程序如下

预变性	95℃	5min	
变性	95℃	30s	
退火	62℃ (根据引物 T _m 值确定)	30s	30cycles
延伸	72℃	30s	
延伸	72℃	5min	

反应结束后用 1.5-2%琼脂糖凝胶电泳进行分析。

3.7.2 qPCR 检测及富集效率确认

- 1) qPCR 反应包括如下组: 按一定比例稀释 5% input DNA 4-5 组 (用于生成标准曲线并测定扩增效率), 实验组、阴性对照组、阳性对照组、未加模板组, 进行 qPCR 加样检测。
- 2) qPCR 反应体系及条件可根据所用 SYBR Green 法检测 DNA 试剂盒确认
Percentage of Input = $5\% \times 2^{(Ct[input]-Ct[IP \text{ 样品}])}$

3.7.3 ChIP-Seq

根据检测公司的要求, 提供符合要求的 DNA 样品进行高通量检测 DNA 序列, 如果 DNA 样品浓度和总量不能达到要求, 可提高实验初始细胞量, 按照说明书中步骤等比例放大试剂。

4. 问题及解决方案

问题	原因分析	推荐解决方案
超声后染色质浓度过低	1. 细胞/细胞核裂解不完全; 2. 染色质制起始细胞数不足。	1. 确保每次免疫沉淀使用含使用 DNA 不少于 5 μg 的染色质; 2. 交联前, 对单独平板上的细胞进行计数, 以确定准确的细胞数量。
阴性对照 IgG 样品背景高	1. 抗体加入太多, 导致过量的抗体进行非特异性结合; 2. 试剂被污染; 3. 蛋白质-抗体复合物清洗不彻底	1. 减少抗体用量; 2. 确保试剂、吸头、离心管干净无污染; 3. 增加清洗时间。
DNA 回收低, 使得 PCR 产物没有或很少	1. ChIP 抗体失效或者亲和力低; 2. 抗体使用量不足; 3. 超声的细胞太少; 4. 交联时间太长或不足。	1. 更换经 ChIP 验证过的对应物种抗体; 2. 抗体使用量一般不少于 2μg, 可以做梯度摸索最佳抗体量; 3. 增加起始细胞量; 4. 交联时间通常在 10-30min, 可做梯度摸索最佳时间。

5. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
染色质免疫共沉淀 (ChIP) 试剂盒	BK0045-01	24T

6. 附录

6.1 优化甲醛固定

细胞或组织样品的组蛋白, 与 DNA 结合牢固, 所以通常固定 10min 即可, 而转录因子和辅助因子, 结合染色质没有组蛋白紧密。所以,



在 ChIP 实验中, 延长固定时间, 能够相对捕获更多的转录因子和辅助因子, 通常固定时间 10-30min, 可设置多个固定时间进行比较, 选择出最合适的固定时间。

6.2 优化染色质超声条件

染色质免疫沉淀的结果与超声效果紧密相连, 超声时间太长, 染色质片段太小, 可能破坏靶标蛋白表位、降低 ChIP 效率。而超声时间太短, 又可能导致靶标蛋白无法暴露抗原结合位点, 使得抗体无法识别抗原决定簇, 导致目的 DNA 不能被富集。所以, 初次实验时, 设置多个超声时间很有必要, 每 1min 设置一个时间点, 取出一部分样品进行检测, 当约 60%-90%DNA 小于 1000bp 时即可。

6.3 rProtein A/G MagPoly Beads 对不同抗体的结合能力

种属	亚型	Protein A/G
Human	IgA	++
	IgD	—
	IgE	—
	IgG1	++++
	IgG2	++++
	IgG3	++++
	IgG4	++++
	IgM	++
Avian egg yolk	IgY	—
Cow		++++
Dog		++++
Goat		++++
Guinea pig	IgG1	++++
	IgG2	++++
Hamster		
Horse	Total IgG	++++
Koala		
Llama		
Monkey(rhesus)		++++
Mouse	IgG1	++
	IgG2a	++++
	IgG2b	+++
	IgG3	+++
	IgM	—
Pig		++++
Rabbit	Total IgG	++++
Rat	IgG1	++
	IgG2a	++++
	IgG2b	++
	IgG3	++
Sheep	Total IgG	++