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………………………………………………………………………………………2
4. 问题及解决方案………………………………………………………………………………5
5. 订购信息及相关产品…………………………………………………………………………5
6. 附录……………………………………………………………………………………………5

1. 产品介绍

ChIP（Chromatin Immunoprecipitation）检测试剂盒，也称染色质免疫共沉淀检测试剂盒，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 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，提供的缓冲液可供六个 15 cm 平板的培养细胞制备染色质，每个平板可提供多达 10 个染色质制剂（随细胞和测定类型的不同而不同），检测时间大约 2-3 天。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、定量实时 PCR 或测序等各种方法进行分析。

表1. 染色质免疫共沉淀（CHIP）试剂盒产品组分

	产品序号	产品名称	规格(24 T)	保存温度
Box A	1	Glycine Solution(2.5 M)	6 mL	2-8°C
	2	ChIP Sonication Buffer	6 mL	
	3	ChIP Buffer	7 mL	
	4	rProtein A/G MagPoly Beads	1 mL	
	5	High Salt and Lysis Buffer	70 mL×2	
	6	Low Salt Buffer	50 mL	
	7	TE Buffer	25 mL	
Box B	8	DNA BL Buffer	13 mL	RT
	9	DNA Binding Buffer	12 mL	
	10	DNA Wash Buffer(使用前添加28 mL无水乙醇)	30 mL	
	11	DNA Elution Buffer	1 mL	
	12	RNase free ddH_2O	1 mL	
	13	Purification Columns（离心柱）	30个	
	14	Collection Tubes（收集管）	30个	
Box C	15	Protease inhibitors(100×)	300 μL	-20°C
	16	Proteinase K(10 mg/mL)	100 μL	
	17	RNase (10 mg/mL)	100 μL	

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 μL-1000 μL）+ 相关吸头
1.5 mL 无 RNase 微量离心管
15 mL 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，Box A 置于 2-8°C保存，Box B 室温保存、Box C -20°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×) 至室温；
3）对于悬浮细胞，每 20 mL 培养液配制 40 mL 1×PBS，冰浴；
4）对于贴壁细胞，每 15 cm 培养皿配制 40 mL 1×PBS，1980 μL 1×PBS+20 μLProtease inhibitors(100×)，全部冰浴；
如若立即进行染色质制备，还需配制 ChIP Sonication Buffer（含 1×Protease inhibitors），每 $1×10^7$-$1.5×10^7$ 个细胞需要 1 mL。

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 10 min 以固定细胞，细胞密度不高于 $5×10^5$/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 (2.5 M) 至上述细胞培养液，使得 Glycine Solution 终浓度为 125 mM, 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 5 min 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）1200 rpm，4°C离心 3 min 弃上清；
4）用 20 mL 预冷的 1×PBS 重悬细胞两次，每次 1200 rpm，4°C离心 3 min，弃上清；
5）收集的细胞可 -80°C冻存三个月或每 $1.0×10^7$-$1.5×10^7$ 个细胞加入 990 μL ChIP Sonication Buffer，10 μL Protease inhibitors 混匀继续下一步实验。
3.1.2.2 贴壁细胞样品
1）对于 15 cm 培养皿（含 20 mL 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 10 min 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 (2.5 M) 至上述细胞培养液，使得 Glycine Solution 终浓度为 125 mM, 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 5 min 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 20 mL 预冷的 1×PBS 清洗细胞，重复清洗一次；
4）每个培养皿加入 2 mL 预冷的含有终浓度 1×Protease inhibitors 的 1×PBS，将细胞刮入清洗液，然后将细胞混合液全部转入 15 mL 离心管，1200 rpm，4°C离心 3 min 弃上清；

5) 收集的细胞可 -80°C冻存三个月或每 1.0×10^7-1.5×10^7 个细胞加入 990 μL ChIP Sonication Buffer，10 μL 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 1.0×10^7-1.5×10^7 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 μL ChIP Sonication Buffer，10 μL Protease inhibitors 混匀，平均转入 2 个 1.5 mL 干净的离心管，冰浴 10 min；

2）将样品置于超声破碎仪中进行染色质超声破碎；

注：1. 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°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；

2. 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 1000 bp 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。超声过程中保持样品处于低温状态，推荐采用水浴超声，效果更好。

3）待细胞溶液变清亮，将超声后的细胞溶液 12000 rpm，4°C离心 10 min（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 μL 用于检测染色质超声效果及 DNA 浓度测定，其余 -80°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°C；

2）从 4°C取出 ChIP Buffer，并 37°C水浴至溶液完全变澄清。

3.3.2 操作步骤

1）取 10 μL 超声后染色质，加入 40 μL ChIP buffer，2 μL Proteinase K，2 μL RNase 混匀后，盖上管盖，封口膜封口离心管，65°C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°C下保存半年；

2）取 DNA 样本＞100 ng，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 1000 bp。

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 2-5 μg，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 5-10 μg DNA 的超声后染色质，转录因子使用含 10-20 μg 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 5 μL Protease inhibitors（100×）后，用 High Salt and Lysis Buffer 稀释至 500 μL，然后每个样品管取 25 μL 作为 5% input 对照（一个样品可以只取一管 input），-20°C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 2-5 μg，根据抗体使用说明书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°C，振荡孵育大于 5 小时或过夜；

3）每个样品对应取 36 μL rProtein A/G MagPoly Beads，提前用 High Salt and Lysis Buffer 清洗平衡三次，每次 700 μL；

4）将 4°C孵育后的样品转入平衡后的 rProtein A/G MagPoly Beads 混匀，4°C振荡孵育 1 h。

3.5 洗脱、解交联

3.5.1 实验前准备

1）4°C取出 ChIP Buffer，并 37°C水浴至溶液完全变澄清；

2）水浴锅设定温度 65°C；

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°C孵育的磁珠，放入磁力架上静置 1 min，待磁珠完全被吸附后，弃液体；

2）每个离心管中加入 1 mL 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 1 mL 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 1 mL 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 150 μL ChIP buffer，2 μL Proteinase K，2 μL RNase 混匀后，盖上管盖，封口膜封口离心管，65°C孵育 4 h。期间混匀离心管数次；
6）取出步骤 3.4.2 中 -20°C冻存的 25 μL input，加入 125 μL ChIP buffer，2 μL Proteinase K，2 μL RNase 混匀后，盖上管盖，封口膜封口离心管，65°C孵育 4 h。期间混匀离心管数次。

3.6 离心柱法纯化 DNA

3.6.1 实验前准备
第一次使用时向 DNA Wash Buffer 中加入 28 mL 无水乙醇；
将离心柱放入收集管，加入 500 μL DNA BL Buffer，12000 rpm 室温离心 1 min，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 450 μL 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 2 min，12000 rpm，室温离心 1 min；
2）弃收集管中液体，离心柱放回收集管，加入 600 μL DNA Wash Buffer，室温放置 3-5 min 后，12000 rpm 室温离心 1 min；
3）弃收集管中液体，离心柱放回收集管，加入 600 μL DNA Wash Buffer, 12000 rpm 室温离心 1 min；
4）弃收集管中液体，离心柱放回收集管，12000 rpm 室温离心 2 min；
5）将离心柱重新放入一干净的 1.5 mL 离心管，室温静置 2 min 后，在离心柱中心位置加入 40 μL DNA Elution Buffer 或 RNase free ddH_2O；
6）室温放置 2 min 后，12000 rpm 室温离心 2 min，洗脱 DNA，1.5 mL 离心管收集的液体即为纯化的 DNA（-20°C可保存 6 个月）。

3.7 PCR 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 150-200 bp，qPCR 建议扩增大小 80-160 bp；
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。

普通 PCR 反应（仅供参考）

PCR 反应体系如下：

试剂	1个PCR反应体积
10×PCR buffer	2 μL
4 mM dNTPs	1 μL
10 μM引物	1 μL
DNA模板	2 μL
Taq DNA聚合酶	0.5 μL
RNase free ddH_2O	13.5 μL

PCR 反应程序如下：

预变性	95°C	5 min	
变性	95°C	30 s	30 cycles
退火	62°C（根据引物Tm值确定）	30 s	
延伸	72°C	30 s	
延伸	72°C	5 min	

反应结束后用 1.5-2% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

qPCR 检测及富集效率确认

1.PCR 反应包括如下组：按一定比例稀释 5% input DNA4-5 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= $5\%\times2^{(Ct[input]-Ct[IP\ 样品])}$

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 DNA 含量不少于 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 2 μg，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 10-30 min，可做梯度摸索最佳时间。

5. 订购信息及相关产品

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

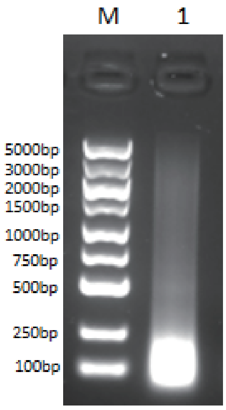
6. 附录

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 10 min 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 10-30 min，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 1 min 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 1000 bp 时即可。



以 293 T 细胞为样品，交联 10 min，超声 20 min 后，取 10 μL 解交联后，利用离心柱法提取 DNA，取 5 μL 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

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	++