

## 染色质免疫沉淀检测试剂盒

### ChIP Assay Kit (Protein A/G 磁珠)

#### 一、产品介绍

ChIP Assay Kit，也称为染色质免疫沉淀检测试剂盒或 ChIP 检测试剂盒，用于通过免疫沉淀来沉淀与靶蛋白结合的染色质片段，最后通过 PCR 或 Southern 等方法来检测沉淀的染色质片段的试剂盒。

本试剂盒内含阴性对照正常 Rabbit IgG (HA722127)、阳性对照抗体 Histone H3 mAb (ET1701-64)，并同时提供人源的 RPL30 阳性引物对照，有助于监测 ChIP 实验并提高结果准确度。

#### 二、包装清单

产品编号	试剂名称	包装	储存条件
K1804-1	Protein A/G 磁珠	1 mL	4 °C
K1804-2	甘氨酸溶液 (10x)	30 mL	4 °C
K1804-3	Low Salt Wash Buffer	25 mL	4 °C
K1804-4	High Salt Wash Buffer	25 mL	4 °C
K1804-5	LiCl Wash Buffer	25 mL	4 °C
K1804-6	5M NaCl	500 μL	4 °C
K1804-7	TE buffer (100x)	1 mL	4 °C
K1804-8	SDS Lysis Buffer	20 mL	-20 °C
K1804-9	ChIP Dilution Buffer	25 mL x 2	-20 °C
K1804-10	Human RPL30 阳性对照引物 (10 μM each)	100 μL	-20 °C
HA722127	正常 rabbit IgG mAb 阴性对照抗体	20 μg	-20 °C
ET1701-64	Histone H3 mAb 阳性对照抗体	20 μg	-20 °C

#### 注意事项：

- 需自备试剂：37%甲醛，蛋白酶抑制剂混合物 PIC，1xPBS，蛋白酶 K，磁力分离架，DNA 纯化试剂盒，SYBR Green qPCR 试剂盒。
- 需自备设备：超声细胞粉碎机，金属浴。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用途，不得用于临床诊断和治疗，不得用于食品和药品的生产，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的健康和安全，请穿实验服并佩戴手套操作。

#### 三、操作流程

##### 3.1 细胞样品交联与样品制备

为了获得最优的 ChIP 结果，一个标准的 ChIP 反应需要约  $4 \times 10^6$  个细胞处理后获得的染色质，以 HeLa 细胞为

例，15 cm 培养皿，20 ml 培养基中 90% 生长密度下的细胞量约为  $1.2 \times 10^7$  个细胞。单次 ChIP 实验应包含阴性对照 (IgG)、阳性对照组蛋白 H3 抗体和靶蛋白抗体等进行免疫沉淀的足量样品，因此建议每次实验处理足量的细胞，用于满足后续多个沉淀反应和重复实验需求。以一个样品组为标准，准备约为  $1 \times 10^7$  到  $2 \times 10^7$  个细胞（每个样品组能满足同时进行阴性对照 IgG、阳性对照组蛋白 H3 和靶蛋白抗体等多个 ChIP 反应的用量）。以下试剂计量为一个样品组计算，此足量细胞数能满足包括低染色质含量的细胞在内的各类细胞的 ChIP 实验，同时染色质量适宜进行超声片段化处理。

**注意：**建议在开展正式实验前，先进行预实验，以熟悉实验体系和了解并优化所用样本的各项条件。预实验时，需要额外准备一个细胞样品组，对染色质剪切效率和浓度进行检测（参照第 3.3 部分）。

3.1.1 准备适量冰浴预冷的 1xPBS，以及适量的 100x 蛋白酶抑制剂 PIC。

3.1.2 为了使蛋白与 DNA 交联，向每个含有 20mL 培养基的 15 cm 培养皿中加入 540  $\mu$ L 37% 甲醛（可根据培养基体积调整，保证甲醛终浓度为 1% 即可）。轻轻混匀，随即在 37 °C 培养箱孵育 10 分钟。加入甲醛后，培养基的颜色会发生改变。

3.1.3 每个 15 cm 培养皿中加入 2 mL 甘氨酸溶液 (10x, 1.25M)，轻轻混匀，室温孵育 5 分钟，来终止上述固定反应。加入甘氨酸后，培养基的颜色会发生改变。

3.1.4 对于悬浮细胞：

a. 收集固定后的细胞到离心管中，4°C 1,000 g 离心 5 分钟沉淀细胞后，用冰浴预冷的 1xPBS 漂洗两次 (10-20 mL/次)。去除上清后可立即进行后续的染色质处理（见 4b 部分），或暂停实验，细胞样品可保存在 -80 °C。

b. 每  $2 \times 10^7$  细胞重悬于 1 mL SDS Lysis Buffer（加入蛋白酶抑制剂 PIC），立即进行后续的染色质超声剪切。

3.1.5 对于贴壁细胞：

a. 弃去培养基后，用冰浴预冷的 1xPBS 漂洗两次 (10-20 mL/次)，每次吸净 PBS。

b. 加入 2 mL 冰浴预冷的含 PIC 的 1xPBS，将细胞刮下，并将所有细胞收集至离心管中。

c. 4 °C, 1,000 g 离心 5 分钟收集细胞。去除上清后立即进行后续的染色质处理（见 5d 部分）。或暂停实验，细胞样品可保存在 -80 °C。

d. 每  $2 \times 10^7$  细胞重悬于 1 mL SDS Lysis Buffer（加入蛋白酶抑制剂 PIC），立即进行后续的染色质超声剪切。

## 3.2 组织样品交联与样品制备

当收取组织样品进行 ChIP 实验时，要尽量去除脂类，坏死组织等无关组织。组织样品可直接进行交联处理，或置于干冰上稍后处理。为了获得最优的 ChIP 结果，推荐每个标准的 ChIP 反应需要约 25 mg 组织样品处理后获得的染色质。不同组织类型中的染色质含量有差异，为获得适量的染色质样品可根据预实验结果适当调整组织用量。

**注意：**预实验时，需要额外准备约 5 mg 组织样品，进行染色质片段化效率和染色质浓度检测，并可作为 Input 内参对照。

单次 ChIP 实验应包含阴性对照 (IgG)、阳性对照组蛋白 H3 抗体和靶蛋白抗体等进行免疫沉淀的足量样品，因此建议每次实验处理足量的细胞，用于满足后续多个沉淀反应和重复实验需求。以一个样品组为标准，准备约为  $1 \times 10^7$  到  $2 \times 10^7$  细胞（每个样品组能满足同时进行阴性对照 IgG、阳性对照组蛋白 H3 和靶蛋白抗体等多个 ChIP 反应的用量）。以下试剂计量为一个样品组计算。

a. 准备适量冰浴预冷的 1xPBS，以及适量的 100x 蛋白酶抑制剂 PIC。

b. 称取新鲜或冻存的组织样品，每个样品组需准备样品 100 到 150 mg 组织。

- c. 样品置于 10 cm 培养皿中，用解剖刀或剪刀剪碎成 1-2 mm 大小碎块。过程中保持低温，避免蛋白降解。
- d. 转移切碎的组织到 15 mL 锥型离心管中，并加入 1 mL 冰预冷的 1xPBS（含 PIC）。

3.2.1 为了使蛋白与 DNA 交联，向上述每个样品组中（1 mL）加入 28  $\mu$ L 37% 甲醛（可根据培养基体积调整，保证甲醛终浓度为 1% 即可）。轻轻混匀，室温低速摇动不少于 10 分钟。

- a. 组蛋白或组蛋白修饰靶点，推荐交联时间为 10 分钟即可；
- b. 对于转录因子，推荐交联时间为 10 到 30 分钟；
- c. 对于转录辅因子，推荐交联时间为 30 分钟。

3.2.2 向每个样品组中（1 mL）加入 100  $\mu$ L 甘氨酸溶液（10x, 1.25 M），轻轻混匀，室温孵育 5 分钟，来终止上述固定反应。

3.2.3 4 °C, 1,000 g 离心 5 分钟收集组织，吸净上清。

3.2.4 加入 2 mL 预冷 1xPBS（含 PIC）漂洗 2 次，4 °C, 1,000 g 离心 5 分钟收集组织，吸净上清。

3.2.5 去除上清后，加入 1 mL SDS Lysis Buffer（加入蛋白酶抑制剂 PIC）重悬样品并置于冰上。

3.2.6 组织匀浆器研磨，将组织样品分解成单细胞悬液无组织块可见，转移上清至离心管中进行后续的染色质超声破碎处理。

### 3.3 染色质超声破碎

3.3.1 上述样品（或从 -80 °C 取出样品重悬在 1 mL 含 PIC 的 SDS Lysis Buffer 中），冰上孵育 10 分钟，每 3 分钟颠倒混匀一次。

#### 3.3.2 超声处理染色质片段

超声条件需根据超声仪的功率和超声间隔时间等来进行优化。一般来说，超声优化条件是能够将 60% 到 90% 的染色质片段随机打断到 1000 bp 以下。延长样品交联时间或交联温度过高，会显著降低染色质超声破碎效率。另外，过度超声会破坏染色质上抗原表位，导致抗体富集效率降低引起的 ChIP 扩增信号下降等问题。因此，建议超声处理样品时，使用可得到理想染色质片段的最小超声循环数即可。如果发现延长超声时间，也始终无法达到理想的破碎后染色质范围，建议重新制备样品。

- d. 针对接触式探头新芝超声仪的摸索条件：2 mm 直径微探头，振幅 20%（功率为 130 W），超 5 s，停 15 s，设置超声时间梯度 2, 4, 8, 12, 16 分钟。如 HeLa 细胞时间 2 分钟就可得到较好的染色质片段化样品。
- e. 使用非接触式（循环降温冰水浴）超声仪进行超声破碎：根据仪器说明书，根据待超声样品体积设定合适功率（一般 500  $\mu$ L 以下样品，功率可以设定在 50-100 W 之间），设定合适的超声循环和总运行时间。同样建议每次 ChIP 超声实验前，针对不同样品预先摸索超声条件和超声时间，可以做几个运行时间梯度（如 1, 2, 3, 4, 5 分钟...）。
- f. 不同的细胞超声条件可能会不一样，需做预实验，需要注意的是每次的超声体积和细胞用量宜固定，否则就不能使用一个相对比较固定的超声条件用于后续实验。超声过程中请一定注意要保持样品处于冰浴中，并且处于较低温度。不要使探头接触超声管底部或管壁，如超声过程产生泡沫，需暂停超声并调整超声管位置。
- g. 超声用的 buffer，SDS 浓度越高，DNA 越容易被打断；盐离子或去垢剂浓度越高，DNA 越容易被打断；细胞密度越大，DNA 越不容易被打断；相对于常用的肿瘤细胞系，很多原代细胞及组织细胞的染色质超声破碎会更困难些，如 T 细胞往往很难进行超声检测，因为它们是非常小、紧密的细胞，这个时候需要不同的溶解和超声条件才能实现最好的结果，可将交联反应时间降至 5 分钟。

3.3.3 超声破碎完成后，4 °C, 12,000-14,000 g 离心 10 分钟，除去样品中的细胞核等碎片和其他不溶物。

3.3.4 将上清转移至新的离心管中，充分混匀后取 5  $\mu\text{L}$  染色质溶液进行琼脂糖凝胶分析以确定 DNA 片段大小，检测超声效率（可将超声前和超声后各取的 5  $\mu\text{L}$  染色质溶液对比分析）。剩余染色质溶液在下一步使用之前可保存在-80 °C冰箱。

#### 3.4 染色质免疫沉淀

3.4.1 新鲜配制适量含 PIC 的 ChIP Dilution Buffer，置于冰上。

3.4.2 取上清（约 0.1 mL）新的离心管中，并加入 900  $\mu\text{L}$  含 PIC 的 ChIP Dilution Buffer 以稀释经过超声处理的样品，使最终体积为 1 mL。

3.4.3 取出 20  $\mu\text{L}$  (2%) 样品作为 Input 并暂时保存在-20 °C冰箱，用于后续检测。

3.4.4 在各目的蛋白样品管中加入对应抗体，抗体量为 2-5  $\mu\text{g}$ 。同时加入同量的组蛋白 H3 阳性对照及 IgG 阴性对照。将反应管封严，在 4°C 的转子上孵育 4 小时以上或过夜。

3.4.5 轻轻重悬混匀 Protein A/G 磁珠，取 30  $\mu\text{L}$  加入到每个免疫沉淀反应中，重新封严反应管，4 °C 的转子上孵育 2 小时。

3.4.6 将反应管置于磁力分离架上，等 1-2 分钟溶液澄清后，小心地将上清吸走，切勿触及磁珠。

3.4.7 依次 1 mL 如下漂洗液对磁珠进行漂洗，在 4 °C 的转子上转动洗涤 5 分钟，随后置于磁力分离架上，等 1-2 分钟溶液澄清后，小心地将上清吸走。

a. Low Salt Wash Buffer 洗涤一次。

b. High Salt Wash Buffer 洗涤一次。

c. LiCl Wash Buffer 洗涤一次。

d. TE Buffer 洗涤两次。

#### 3.5 洗脱并解交联

3.5.1 新鲜配制适量 Elution buffer (1% SDS, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>)。

完成 3.4 部分所有洗涤步骤后，在每组对应的 Input 和免疫沉淀样品中分别加入 150  $\mu\text{L}$  Elution buffer。

3.5.2 将上述样品置于 65 °C 金属浴中孵育 30 分钟，中间每隔 5 分钟用涡旋混合器轻轻震荡，将染色质从磁珠上洗脱下来。

注：此步用金属温控振荡器效果最好。

3.5.3 10,000 g 离心 10 秒收集离心管盖子上的残留样品。

3.5.4 将离心管置于磁力分离架上，等 1-2 分钟使溶液澄清，将上清转移到一新的离心管中，并分别标记。

3.5.5 所有管（包括 Input 管）中，都加入 6  $\mu\text{L}$  5 M NaCl 和 2  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K (20 mg/mL)，并在 65 °C 加热 2 小时或过夜，以去除蛋白和基因组 DNA 之间的交联。

3.5.6 可直接进入 3.6 部分，或者可保存样品在-20 °C冰箱，暂停操作。

#### 3.6 离心柱纯化 DNA

150  $\mu\text{L}$  样品，按照 DNA 纯化试剂盒进行操作。以 SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒为例。

3.6.1 向每个 DNA 样品中添加 750  $\mu\text{L}$  DNA 结合缓冲液，涡旋振荡混匀。即每份样品中需添加 5 倍体积的 DNA 结合缓冲液。

3.6.2 样品分两次分别加入到对应标记的吸附柱中。

3.6.3 室温 8,000 g 离心 30 秒。

3.6.4 倒掉收集管中的废液，再将吸附柱插回收集管中。

3.6.5 加入 500 μL wash solution, 9,000 g 离心 30 秒；重复一次。

3.6.6 空柱 10,000 g 离心 1 分钟。

3.6.7 将吸附柱放入一个新的 1.5 mL 离心管中，在吸附膜中央加入 50 μL ddH<sub>2</sub>O（60 °C 提前预热），室温静置 2 分钟后，10,000 g 离心 1 分钟。重复 1 次，最终体积~100 μL。

3.6.8 将每个管中的 DNA 离心柱取出并丢弃，离心管中的洗脱液即为纯化的 DNA。样品可保存在-20 °C 冰箱。

### 3.7 qPCR 定量分析 ChIP 结果

以 ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix (Without ROX) 试剂盒 (Q421-02) 为例。

3.7.1 在 1.5 mL 离心管中配制如下混合液：

试剂	体积
2 x ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix	10 μL
Primer 1 (10μM)	0.4 μL
Primer 2 (10μM)	0.4 μL
ddH <sub>2</sub> O	5.2 μL

3.7.2 qPCR 反应板相应位置加入 16 μL 上述混合液，然后在对应的孔中分别加入 4 μL 3.6 部分纯化的 DNA 样品，封膜，短暂离心（每个样品要设置复孔）。

3.7.3 按下列条件进行 qPCR 反应

Stage 1	预变性	Repeat: 1	95°C	30 s
Stage 2	循环反应	Repeat: 40	95°C 60°C	10 s 30 s
Stage 3	溶解曲线	Repeat: 1	95°C 60°C 95°C 60°C	15 s 60 s Continuous 15 s