



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
 订货热线: 400-1683301 或 800-8283301
 订货 e-mail: order@beyotime.com
 技术咨询: info@beyotime.com
 网址: http://www.beyotime.com

BeyoChIP™ ChIP Assay Kit (Protein A/G磁珠)

产品编号	产品名称	包装
P2080S	BeyoChIP™ ChIP Assay Kit (Protein A/G磁珠)	22次

产品简介:

- BeyoChIP™ ChIP Assay Kit (Protein A/G磁珠)即BeyoChIP™ Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit with Protein A/G Magnetic Beads, 也称染色质免疫沉淀检测试剂盒或ChIP检测试剂盒(蛋白A/G磁珠), 用于通过免疫沉淀来沉淀和目标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。通常用于检测特定的转录因子或组蛋白等基因组DNA结合蛋白是否和预期的特定基因组DNA序列在同一复合物中[1-2]。
- 通过ChIP检测可以获得在体的(In Vivo)目标蛋白和预期基因组DNA片段是否在同一复合物中的结论。EMSA, 也称gel shift获得的结果是体外的(In Vitro)目标蛋白和预期基因组DNA片段的结合结果, 可以推断细胞内也发生类似的结合, 但并不代表该情况在细胞内也真实发生。而ChIP的检测结果则可明确说明这种结合在细胞内是真实发生的[1-2]。
- 本ChIP Assay Kit采用了Protein A/G磁珠(Protein A/G Magnetic Beads), 和Protein A磁珠或Protein G磁珠相比适合于免疫沉淀更多种类的抗体, 包括mouse IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgA, rat IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_{2c}, rabbit IgG, rabbit and goat polyclonal Abs, 以及human IgG₁, IgG₂, IgG₃和IgG₄。磁珠法比琼脂糖法更方便、快捷。常规的琼脂糖法需要长时间离心, 而磁珠法无需离心, 只需要短时间磁性分离即可, 可以有效避免因为离心对免疫复合物造成的机械力影响, 充分保证免疫复合物的天然状态。
- 本试剂盒中经过Salmon Sperm DNA预饱和的Protein A/G Agarose和目的基因组DNA的非特异性结合大大下降。如果ChIP产物用于染色质免疫共沉淀测序(ChIP-Seq), 需要从数据中去除可能的Salmon Sperm DNA数据。
- 提供了预混合的对照引物(Control Primers)。可用于扩增 human GAPDH 的部分相应序列, 引物序列为: 5'-TACTAGCGGTTTACGGCG-3'; 5'-TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA-3'。
- 本试剂盒如果用于常规的染色质免疫沉淀, 共可以免疫沉淀22个样品。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P2080S-1	Protein A/G Magnetic Beads/Salmon Sperm DNA	3ml
P2080S-2	Glycine Solution (10X)	30ml
P2080S-3	ChIP Dilution Buffer	48ml
P2080S-4	Low Salt Immune Complex Wash Buffer	24ml
P2080S-5	High Salt Immune Complex Wash Buffer	24ml
P2080S-6	LiCl Immune Complex Wash Buffer	24ml
P2080S-7	TE Buffer	48ml
P2080S-8	0.5M EDTA	250μl
P2080S-9	5M NaCl	500μl
P2080S-10	1M Tris, pH 6.5	500μl
P2080S-11	SDS Lysis Buffer	10ml
P2080S-12	Control Primers (5μM each)	0.1ml
—	说明书	1份

保存条件:

4°C保存, 一年有效。长期不使用可以-20°C保存, -20°C保存可以保存更长时间。

注意事项:

- 需自备用于ChIP的一抗, 37%甲醛, PBS (C0221A), 蛋白酶抑制剂混合物(哺乳动物样品抽提用, 100X) (P1010/P1011)、蛋白酶抑制剂混合物(哺乳动物样品抽提用, 50X) (P1050/P1051)或PMSF (ST506/ST507), Elution Buffer (1% SDS, 0.1M NaHCO₃), 蛋白酶K (ST532/ST533), Glycogen (DNase, RNase & Protease free) (D0816)或Glycogen (核酸沉淀用) (D0812), Tris平衡苯酚, 氯仿, 95%乙醇, 70%乙醇, 3M NaAc (pH5.2) (ST351)以及细胞刮(FSCP023/FSCP029)或细胞铲(FLFT021), 磁力架(FMS004/FMS008/FMS016/FMS024)。
- 需自备样品超声处理仪(sonicator), 也称超声粉碎机或超声细胞粉碎机。

- 使用甲醛时请在通风橱中进行操作。
- 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。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 样品超声处理条件的优化：

- 准备适量冰浴预冷的PBS，以及适量的蛋白酶抑制剂或蛋白酶磷酸酶抑制剂。将SDS Lysis Buffer适当温浴，使其中的SDS充分溶解，并混匀。
注：推荐使用碧云天的蛋白酶抑制剂混合物(哺乳动物样品抽提用, 100X) (P1010/P1011)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(哺乳动物样品抽提用, 50X) (P1050/P1051)或PMSF (ST506/ST507)。如果涉及蛋白磷酸化，宜添加蛋白酶磷酸酶抑制剂。如果涉及蛋白的乙酰化或甲基化，比较理想的情况，还需要添加相应的蛋白去乙酰化酶和蛋白去甲基化酶抑制剂。PMSF的最终浓度通常以1mM为宜，须注意PMSF水性溶液一定要新鲜配制，其在水相中的半衰期约为30分钟。
- 将细胞培养于10cm细胞培养皿中，细胞培养液的用量为10ml。在预期发生目的蛋白和基因组DNA结合的时间点，直接在细胞培养液中加入适量甲醛，轻轻混匀，至**最终浓度为1%**。随即在**37°C孵育10分钟**，以交联目的蛋白和相应的基因组DNA。例如，对于常规的每个10cm细胞培养皿中加入10 ml细胞培养液的情况，需加入270 μ l 37%甲醛。请注意尽量使用高质量的在有效使用期限内的甲醛。细胞也可以培养于6cm细胞培养皿中，相关溶液的用量需按照比例进行相应调整。
- 加入**1.1ml Glycine Solution (10X)**，轻轻混匀。**室温放置5分钟**。
- 将有细胞样品的培养皿置于冰浴上。**吸尽含甲醛和glycine的培养液**，尽量保持没有液体残留。
- 在上述室温放置5分钟期间，冰浴预冷的PBS中加入适量的蛋白酶抑制剂或蛋白酶磷酸酶抑制剂。
注：推荐使用碧云天的蛋白酶抑制剂混合物(哺乳动物样品抽提用, 100X) (P1010/P1011)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(哺乳动物样品抽提用, 50X) (P1050/P1051)或PMSF (ST506/ST507)。
- 加入**5-10ml冰浴预冷的含蛋白酶抑制剂的PBS**，**洗涤细胞**，吸尽液体，尽量保持没有液体残留。
- 再加入**5-10ml含冰浴预冷的含蛋白酶抑制剂的PBS**，**进一步洗涤细胞**，吸尽液体，尽量保持没有液体残留。
- 加入**1ml冰浴预冷的含蛋白酶抑制剂的PBS**，用细胞刮或细胞铲刮下细胞，收集至离心管中。如果细胞可以用移液器吹打下来，也可以用移液器吹打。对细胞进行计数，分装成每管大约100万细胞。
- 4°C，800-1,000g \times g离心1-2分钟，以充分沉淀细胞。如果发现沉淀不充分，可以适当延长离心时间。吸尽上清，尽量减少液体残留。
- 配制适量含蛋白酶抑制剂的SDS Lysis Buffer。上一步骤的100万细胞沉淀用0.2ml含蛋白酶抑制剂的SDS Lysis Buffer重悬。
- 在冰浴上孵育10分钟，以充分裂解细胞。
- 超声处理，以剪切基因组DNA，使DNA大部分断裂成200-1000bp大小，如果能把大部分控制在400-800bp则更佳。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。超声剪切的效果在后续去交联后可以用常规的DNA琼脂糖凝胶电泳检测。超声处理的条件通常可以设置为每次超声10秒，停10秒，共5-30次左右，实际功率为10-40W，采用2-3mm超声头。不同的超声处理仪器的具体设置可能会不太一样，摸索超声条件时，可以先固定其他条件，先确定每次超声和暂停多长时间(优先推荐尝试每次超声10秒停10秒或者超声10秒停20秒)不会导致明显发热，且无泡沫产生，然后摸索不同的超声次数(例如5、10、20或30次)，通常实际功率越大，总超声时间越少。直至找到比较合适的超声次数可以使大部分基因组DNA断裂成200-1000bp大小。需要注意的是每次的超声体积和细胞种类及用量宜固定，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。
注：在对超声后基因组DNA大小进行检测时，如果采用琼脂糖凝胶中添加NA-Red、NA-Green、Gel-Red或Gel-Green等安全染料或使用含该类安全染料的DNA上样缓冲液的方式，由于电泳时SDS会与此类染料结合形成异常条带，条带通常在500-1000bp左右，因此会对超声后基因组DNA大小的判断造成一定的影响。建议采用“电泳完毕后对琼脂糖凝胶染色”的方式进行条带大小的检测，使用该方法不会有异常条带出现，不影响对超声后基因组DNA大小的判断，而且条带大小更准确。
- 在0.2ml经过超声处理的样品中加入8微升5M NaCl，混匀。65°C加热4小时，以去除蛋白和基因组DNA之间的交联。
- 加入等体积的Tris平衡苯酚，vortex剧烈混匀，随后4°C，12,000 \times g左右离心5分钟。吸取上清至另一离心管中。
- 加入等体积氯仿，vortex剧烈混匀，随后4°C，12,000 \times g左右离心5分钟。吸取上清至另一离心管中。
说明：上述步骤1n和1o的酚氯仿抽提可以使用DNA纯化试剂盒进行操作。例如碧云天的PCR/DNA纯化试剂盒(D0033)。
- 取少量通过酚氯仿抽提或DNA纯化试剂盒获得的液体，对于酚氯仿抽提产物可以取5-10 μ l，对于DNA纯化试剂盒纯化产物可以取2-5 μ l，进行琼脂糖凝胶电泳，观察超声处理对于基因组DNA的剪切效果。

2. 染色质免疫沉淀：

- 在对样品超声处理条件进行优化后，对于待检测样品按照步骤1a-1k进行操作，并参考步骤1l进行超声处理。
- 随后对于经过超声处理的样品在4°C，12,000-14,000 \times g离心5分钟。取上清(约0.2ml)至一2ml离心管中，置于冰浴。
- 配制适量含蛋白酶抑制剂的ChIP Dilution Buffer。加入1.8ml含蛋白酶抑制剂的ChIP Dilution Buffer以稀释经过超声处理的样品，使最终体积为2毫升。
- 取出20 μ l (1%)样品作为Input用于后续检测。其余近2ml样品加入50 μ l Protein A/G Magnetic Beads/Salmon Sperm DNA，在4°C缓慢转动或摆动混匀30分钟。此步骤的目的是减少Protein A/G Magnetic Beads/Salmon Sperm DNA和目的蛋白或目的DNA序列的非特异性结合。然后置于**磁力架上分离10秒**，将上清转移至一个新的2ml毫升离心管中。注：去除非特异性结合为选做。
- 样品中加入**适量一抗**，一抗的用量可以参考抗体的说明书。如果抗体的说明中未给出用于ChIP的稀释比例，可以参考普通的

免疫沉淀的稀释比例。通常一抗的用量为0.5-1 μ g。4 $^{\circ}$ C缓慢转动或摆动混匀过夜或至少4小时以上。注：可以不加抗体作为阴性对照，或更理想地使用正常的IgG (Normal IgG)作为阴性对照，同时可以用没有细胞样品的溶液作为空白对照，加入适量ChIP级别的抗体作为阳性对照。

- f. 加入80 μ l Protein A/G Magnetic Beads/Salmon Sperm DNA, 4 $^{\circ}$ C缓慢转动或摆动混匀60分钟, 以沉淀一抗识别的蛋白或相应的复合物。
 - g. 置于磁力架上分离10秒, 去除上清, 切勿触及磁珠。依次使用如下溶液对磁珠进行洗涤, 每次洗涤液的用量为1ml, 每次4 $^{\circ}$ C缓慢转动或摆动洗涤3-5分钟, 随后置于磁力架上分离10秒, 小心去除上清, 切勿触及磁珠。
 - (a) Low Salt Immune Complex Wash Buffer洗涤一次。
 - (b) High Salt Immune Complex Wash Buffer洗涤一次。
 - (c) LiCl Immune Complex Wash Buffer洗涤一次。
 - (d) TE Buffer洗涤两次。
- 说明：完成上述所有洗涤步骤后所获得的沉淀即可用于PCR扩增目的基因序列或用Southern检测目的基因序列, 或者用于Western检测等。

3. PCR扩增目的基因序列(如果ChIP产物用于检测目的基因序列)。

- a. 新鲜配制适量Elution buffer (1% SDS, 0.1M NaHCO₃)。
- b. 完成步骤2g后, 即完成所有洗涤步骤后, 加入250 μ l Elution buffer。Vortex混匀, 室温转动或摆动继续洗脱3-5分钟。
- c. 置于磁力架上分离10秒, 将上清转移到一新的离心管中。沉淀中再加入250 μ l Elution buffer。Vortex混匀, 室温转动或摆动继续洗脱3-5分钟。
- d. 置于磁力架上分离10秒, 取出上清。和上一步骤, 即步骤3c中获得的上清合并。共计约500 μ l上清。
- e. 在500 μ l上清中加入20 μ l 5M NaCl, 混匀。65 $^{\circ}$ C加热4小时, 以去除蛋白和基因组DNA之间的交联。对于步骤2d获得的作为Input的20 μ l样品, 加入1 μ l 5M NaCl, 混匀, 65 $^{\circ}$ C加热4小时, 同样用于去除蛋白和基因组DNA之间的交联。此步骤完成后可以继续后续步骤, 也可以先-20 $^{\circ}$ C冻存, 第二天继续后续步骤。

注1：此时的样品已经可以用于PCR, 可以尝试使用1、2、5或10 μ l样品作为模板用于PCR检测目的基因。此时PCR的扩增效果和可能被沉淀下来的DNA的量、以及整个PCR扩增体系是否容易扩增目的基因有关。如果发现PCR扩增效果欠佳, 可以考虑通过后续的纯化步骤, 纯化并浓缩样品, 或优化PCR扩增用引物, 然后再进行PCR检测。

注2：通常情况下, 推荐进行后续纯化后再进行PCR检测, 而Input通常不必进行后续纯化步骤。

- f. 在约520 μ l样品中加入10 μ l 0.5M EDTA, 20 μ l 1M Tris, pH 6.5和2 μ l 20mg/ml 蛋白酶K。混匀后45 $^{\circ}$ C孵育60分钟。
 - g. 加入等体积Tris平衡苯酚, vortex剧烈混匀, 随后4 $^{\circ}$ C, 12,000 \times g左右离心5分钟。吸取上清至另一离心管中。
 - h. 加入等体积氯仿, Vortex剧烈混匀, 随后4 $^{\circ}$ C, 12,000 \times g左右离心5分钟。吸取上清至另一离心管中。
 - i. 加入20 μ g Glycogen, 加入1/10体积的3M NaAc, pH5.2, 再加入2.5倍体积无水乙醇。混匀后-70 $^{\circ}$ C沉淀不少于1小时, 或-20 $^{\circ}$ C沉淀8小时以上。
 - j. 4 $^{\circ}$ C, 12,000-14,000 \times g离心10分钟, 小心吸去大部分上清, 切勿触及沉淀。
 - k. 加入约1ml 70%乙醇洗涤沉淀。4 $^{\circ}$ C, 12,000-14,000 \times g离心10分钟, 小心吸去大部分上清, 切勿接触沉淀。
 - l. 4 $^{\circ}$ C, 12,000-14,000 \times g 离心1分钟, 非常小心地吸除残留液体。
 - m. 用少量TE或水重悬DNA沉淀, 用于目的基因的PCR检测。用于PCR的引物最好能设计2组, 可以用Input作为模板预先摸索出相应的PCR条件, 并选择一组效果较好的引物用于最终的PCR检测。少数情况下, 当PCR条带过弱时, 可以采用巢式PCR (Nested PCR)技术, 进行两轮扩增。在用常规PCR扩增出目的条带后, 后续可以直接使用样品进行qPCR定量检测, 也可以使用该样品进行建库和高通量测序(ChIP-seq)。
- 注：步骤3g至步骤3m也可以采用适当的DNA纯化试剂盒纯化DNA, 例如碧云天的PCR/DNA纯化试剂盒(D0033)或BeyoMagTM磁珠法PCR/DNA纯化试剂盒(D0041)。

4. Western检测ChIP产物(如果ChIP产物用于Western检测)：

- a. 接步骤2g, 在完成所有的洗涤步骤后, 加入25 μ l SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(1X)。SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(1X)可以用SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5X)用水稀释配制而成。沸水浴煮沸10分钟。
- b. 可以取10-20 μ l用于Western检测。

参考文献：

1. Orlando V. Trends Biochem Sci. 2000. 25(3):99-104.
2. Wells J, Farnham PJ. Methods. 2002. 26(1):48-56.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0221A	PBS	500ml
D0812	Glycogen (核酸沉淀用)	500 μ l
D0816	Glycogen (DNase, RNase & Protease free)	0.5/2/10ml
P2078	ChIP Assay Kit	22次
P2080S	BeyoChIP TM ChIP Assay Kit (Protein A/G磁珠)	22次
P2083S	BeyoChIP TM Enzymatic ChIP Assay Kit (Protein A/G磁珠)	22次

R0040	Yeast RNA (DNase, RNase &Proteinase Free)	0.5/2/10ml
ST041-2ml	0.5M DTT (DNase, RNase & Protease free)	2ml
ST041-10ml	0.5M DTT (DNase, RNase & Protease free)	10ml
ST347-250ml	5M NaCl (无菌)	250ml
ST351	3M NaAc, pH5.2 (Sterile, DNase free)	100ml
ST506	PMSF (100mM)	10ml
ST507-10ml	PMSF Solution (100mM)	10ml
ST532	Proteinase K (20mg/ml)	0.2ml
ST533	Proteinase K (20mg/ml)	1ml
ST576	RNase A (10mg/ml, DNase free)	1ml
ST577	RNase A (100mg/ml, DNase free)	0.5ml
ST876	BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)	100/500ml
FSCP023	BeyoGold™ 23cm细胞刮(独立纸塑包装, 无菌)	100个/盒
FSCP029	BeyoGold™ 29cm细胞刮(独立纸塑包装, 无菌)	100个/盒
FLFT021	BeyoGold™ 21cm细胞铲(独立纸塑包装, 无菌)	100个/盒
FMS004	BeyoMag™磁分离架(4孔, 1.5ml/2ml, 蓝)	1个/盒
FMS008	BeyoMag™磁分离架(8孔, 1.5ml/2ml, 蓝)	1个/盒
FMS012	BeyoMag™磁分离架(12孔)	1个/袋
FMS016	BeyoMag™磁分离架(16孔, 1.5ml/2ml, 蓝)	1个/盒
FMS024	BeyoMag™磁分离架(24孔)	1个/袋

Version 2024.02.22