

货号	名称	规格	存储
F1704-12T	ChainFree® DYKDDDDK-Tag (Flag-Tag) ChIP 试剂盒	12T	-20℃
F1704-24T	ChainFree® DYKDDDDK-Tag (Flag-Tag) ChIP 试剂盒	24T	-20℃

产品简介

染色质免疫共沉淀 (ChIP) 是研究体内 DNA 与蛋白结合的技术。本试剂盒采用 ChainFree® Anti-Flag 磁珠来高效完成 Flag 标签 (DYKDDDDK) 融合蛋白的 ChIP 实验。ChainFree® Anti-Flag 磁珠偶联的是经过严格筛选、优化并重组表达的无轻、重链的 Flag 抗体, 所以 IP 洗脱液中不会有抗体轻、重链污染。

实验前将 Flag 标签与目标蛋白在细胞或组织中融合表达。实验时, 先用甲醛交联细胞内的“蛋白-DNA”复合物, 裂解细胞后, 用超声波破碎 DNA 至适合的长度, 采用 ChainFree® Anti-Flag 磁珠捕获细胞内的 Flag 标签融合蛋白及其结合的 DNA 片段, 去除未结合的 DNA 后, 将蛋白与 DNA 解交联, 提取结合的 DNA。该 DNA 可用于后续的定量 PCR 检测 (qPCR) 或高通量测序 (seq)。

试剂盒成分

编号	名称	12T 规格	24T 规格	储存条件
①	ChainFree® Anti-Flag 磁珠	250 μL	500 μL	4℃, 1 年
②	裂解缓冲液	7 mL	14 mL	4℃, 1 年
③	漂洗液	25 mL	50 mL	4℃, 1 年
④	洗脱缓冲液	400 μL	800 μL	-20℃, 1 年
⑤	10xTE 缓冲液	550 μL	1.1 mL	4℃, 1 年
⑥	NaCl (5 M)	260 μL	520 μL	4℃, 1 年
⑦	蛋白酶抑制剂	190 μL	380 μL	-20℃, 1 年
⑧	RNase A	130 μL	260 μL	-20℃, 1 年
⑨	Proteinase K	130 μL	260 μL	-20℃, 1 年
⑩	10mL 离心管	1 个	1 个	—

***注意:** 该试剂盒包含足够完成 12、24 或 40 个反应的试剂, 每个反应使用 20 μL 磁珠。由于每次 IP 实验至少需要设置一个实验组和一个阴性对照组, 因此一次实验至少需要使用 2 个反应的试剂量。

额外所需材料

1. 自备材料: Flag 抗体 (用于 Western-Blot 检测)、PBS、甲醛、甘氨酸、无水乙醇、80%乙醇、苯酚、氯仿、异戊醇、ddH₂O。
2. 所需仪器: 磁力架、混匀仪、低温离心机、超声波破碎仪。

使用说明

I 注意事项

1. 请勿干燥或剧烈涡旋磁珠, 禁止长时间置于磁场, 这些操作可能会引起磁珠聚团, 降低结合活性。
2. 为保证磁珠均匀分布, 请在使用前通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀磁珠。
3. 具体样品量和孵育时间依赖于每个特定体系, 可能需要优化才能得到最大产量。
4. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

II 实验前准备工作: 细胞交联

- (1) 实验组和对照组分别取 3×10^7 个细胞, 预冷的 PBS 漂洗 2~3 次, 彻底去除培养基成分, 4° C 1000g 离心 5 min 收集沉淀;
- (2) 加入 10 mL PBS (含 270 μL 37%甲醛, 甲醛终浓度为 1%) 重悬细胞, 放混匀仪上室温交联 10 min;

- (3) 加入 1 mL 1.375 M 甘氨酸，放混匀仪上室温孵育 5 min，之后将样品置于冰上；
- (4) 4°C 1000 g 离心 5 min 收集细胞，弃上清；
- (5) 加 10mL 预冷的 PBS 漂洗细胞 2~3 次，彻底去除交联剂成分，4°C 1000 g 离心 5 min 收集细胞沉淀，液氮速冻 3 min，-80°C 保存。

III 操作步骤

1. 细胞裂解及染色质超声打断

- (1) 将样本管置于冰上，每组加入 500 μL ②裂解缓冲液、5 μL ⑦蛋白酶抑制剂（按 1%添加），吹打混匀。
- (2) 超声打断染色质，超声过程样品应始终处于冰浴中，并保持较低温度，以防染色质过热变性；超声条件因细胞类型和超声设备而异，请务必提前摸索好合适的超声打断条件，使 DNA 片段大小在合适范围；摸索超声条件时，可以先固定其他条件，先确定每次超声多长时间不会导致明显发热，再摸索不同的超声次数；需要注意的是每次超声的体积和细胞用量最好固定，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。

【参考条件：非接触式全自动超声波破碎仪，高功率，30 s +30 s（超声 30 s，暂停 30 s）超声 28 轮；接触式超声仪，35%功率，2 s+5 s（超声 2 s，暂停 5 s）超声 15 min。】

- (3) 4°C 13000 g 离心 10 min，取上清至新的离心管中。
- (4) 取 5 μL 上清进行解交联（见下述步骤 4 “解交联”，其中 ⑧RNase A 和 ⑨Proteinase K 的用量均为 1.5 μL），并电泳检测 DNA 片段大小；打断的 DNA 通常在 100~1000 bp 中间，ChIP-Seq 要求 DNA 片段最好在 100~500 bp 之间，ChIP-qPCR 要求 DNA 片段最好在 300~1000 bp 之间。
- (5) 如果 DNA 片段化不成功，则将步骤(3)获得的上清液继续超声，直至获得合适大小的 DNA 片段；如果片段化成功，则从上清液中取 30 μL 作为蛋白 input，取 30 μL 作为 DNA input，剩余用于 ChIP 实验，-80°C 保存。

*** 注意：**如果样本中目标蛋白丰度较低，或结合物间的结合较弱，可以增加初始样本量，同时等比例增加裂解缓冲液和酶抑制剂的用量，但总孵育体积最大不超过离心管体积的 2/3，体积过大可以更换大规格离心管。

2. 漂洗液准备

为了防止实验过程中的蛋白降解，需要向漂洗液中添加蛋白酶抑制剂。取出⑩10 mL 离心管，加入实验组和对照组总共所需的 3.8 mL ③漂洗液、19 μL ⑦蛋白酶抑制剂（按 0.5%添加），混合均匀，冰上保存，现配现用。如果有多组样本，请按照实际使用量配置。

3. 染色质免疫共沉淀（ChIP）

- (1) 将⑪ChainFree® Anti-Flag 磁珠颠倒混匀，实验组和对照组各取 20 μL 磁珠到新的离心管中；
- (2) 每组加入 200 μL 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (3) 重复上步操作一次；
- (4) 向磁珠中加入样本裂解液（步骤 1 制备），放混匀仪上室温孵育 1 h 或 4°C 孵育 4 h；
- (5) 放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (6) 每组加入 500 μL 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (7) 重复上步操作一次；
- (8) 再次加入 500 μL 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，之后取 100 μL 移入新的离心管中用于蛋白检测（标注为管 1），剩余 400 μL 用于 DNA 提取（标注为管 2），两管分别放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (9) 向管 1 中加入 20 μL 1×SDS-PAGE 上样缓冲液并煮沸 3 min，放磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中，该 ChIP 样本与蛋白 input 都用于诱饵蛋白的 Western-Blot 检测；
- (10) 向管 2 中加入 30 μL ④洗脱缓冲液，涡旋震荡 20 s，混匀仪上室温洗脱 10~15 min；涡旋震荡 20 s，1000 g 离心 20 s，放磁力架上静置 1 min；收集上清至新的离心管中，用于解交联和 DNA 提取。

4. 解交联

- (1) DNA Input 和 ChIP 样品置于 65℃ 孵育 6 h 或者过夜；
- (2) 每管加入 8 μL ⑧RNase A，颠倒混匀 10~15 次，37℃ 孵育 0.5~2 h；
- (3) 每管加入 8 μL ⑨Proteinase K，55℃ 孵育 2 h。

5. 沉淀 DNA

- (1) 每管分别加入 330 μL ddH₂O、40 μL ⑤10x TE 缓冲液和 400 μL 苯酚:氯仿:异戊醇混合液 (25:24:1)，颠倒混匀 10~15 次，室温 13000 g 离心 10 min，转移上层水相到新的离心管中；
- (2) 每管加入 20 μL ⑥NaCl 和 1 mL 无水乙醇，-20℃ 沉淀 2 h 或过夜，4℃ 16000 g 离心 30 min，去上清；
- (3) 加入 500 μL 80%乙醇洗涤沉淀，4℃ 16000 g 离心 30 min，去上清，开盖晾干乙醇；
- (4) 加入 20 μL ddH₂O，溶解沉淀 DNA，-80℃ 保存。

问题解决

问题	可能原因	解决方案
染色质无法打断/太短	交联时间过长/过短	改善交联时长
	超声条件不合适	重新摸索超声条件
获得的诱饵蛋白量少	样品中的诱饵蛋白含量低	提高样本用量
获得的 DNA 量少	样本量不够	提高细胞用量，或增加细胞量与抗体磁珠的比例