

| 货号        | 名称                   | 规格  | 存储   |
|-----------|----------------------|-----|------|
| F1708-12T | mCherry-Tag ChIP 试剂盒 | 12T | -20℃ |
| F1708-24T | mCherry-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 Anti-mCherry 纳米抗体磁珠来高效完成mCherry融合蛋白的ChIP实验。Anti-mCherry 磁珠偶联的是经过严格筛选、优化并重组表达的mCherry纳米抗体，所以IP洗脱液中不会有抗体轻、重链污染。实验前将mCherry序列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Anti-mCherry 磁珠捕获细胞内的mCherry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  | Anti- mCherry 磁珠 | 250 $\mu$ L | 500 $\mu$ L | 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 $\mu$ L | 800 $\mu$ L | -20℃, 1 年 |
| ⑤  | 10xTE 缓冲液        | 550 $\mu$ L | 1.1 mL      | 4℃, 1 年   |
| ⑥  | NaCl (5 M)       | 260 $\mu$ L | 520 $\mu$ L | 4℃, 1 年   |
| ⑦  | 蛋白酶抑制剂           | 190 $\mu$ L | 380 $\mu$ L | -20℃, 1 年 |
| ⑧  | RNase A          | 130 $\mu$ L | 260 $\mu$ L | -20℃, 1 年 |
| ⑨  | Proteinase K     | 130 $\mu$ L | 260 $\mu$ L | -20℃, 1 年 |
| ⑩  | 中和液              | 40 $\mu$ L  | 80 $\mu$ L  | 4℃, 1 年   |
| ⑪  | 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  $\mu$  L 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：mCherry 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、ddH<sub>2</sub>O。
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  $3 \times 10^7$  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  $\mu$  L 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℃ 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℃ 1000 g 离心 5 min 收集细胞沉淀，液氮速冻 3 min，-80℃ 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℃ 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℃ 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⑪10 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①Anti-mCherry 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；

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℃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，加入 3 μL ⑩中和液，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  $\mu$ L ⑧RNase A, 颠倒混匀 10~15 次, 37℃ 孵育 0.5~2 h;
- (3) 每管加入 8  $\mu$ L ⑨Proteinase K, 55℃ 孵育 2 h。

## 5. 沉淀 DNA

- (1) 每管分别加入 330  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O、40  $\mu$ L ⑤10x TE 缓冲液和 400  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 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 |