吉赛生物
GENESEED

PureBinding® Chromatin immunoprecipitation Kit

Cat.No. P0301 (12 rxns)

Cat.No. P0302 (24 rxns)

Sufficient reagent for ChIP assays per kit

按试剂标签提示分开储存

For research use only, not intended for diagnostic testing.

目录

目录 1
背景介绍 1
应用范围 1
实验原理图 1
试剂盒组分 2
自备材料 2
实验操作 3

背景介绍

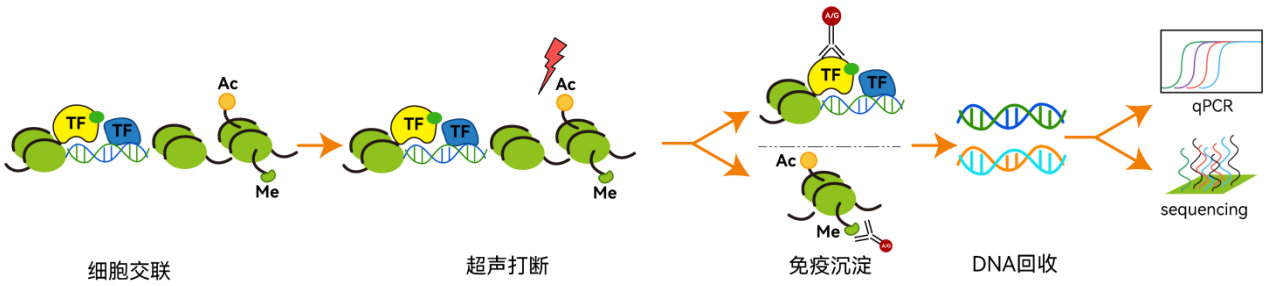
转录是遗传信息从 DNA 到 RNA 传递的关键步骤，也是 RNA 生物合成的最主要形式。转录因子（transcription factor）是一类能与基因 5’端特定序列专一性结合，使目的基因以特定的强度在特定的时间与空间表达的蛋白质分子，是参与转录调控的关键因素之一。

染色质免疫沉淀（Chromatin immunoprecipitation，ChIP）是一种分析 DNA 与蛋白质相互作用的研究方法。它的基本原理是活细胞或新鲜组织经过交联方式锁定核蛋白（转录因子、DNA 损伤修复蛋白、组蛋白或 DNA 修饰酶、读取酶、去修饰酶等）与靶基因互作关系，再利用超声波物理法或生物酶法使染色质片段化，最后用核蛋白的特异性抗体，通过免疫结合的方式富集核蛋白所结合的 DNA 片段。

应用范围

1. 验证已知蛋白-DNA 相互作用；
2. 研究转录因子的靶向基因及结合位点；
3. 研究 DNA/RNA 聚合酶、转录复合物在基因组上的作用位点；
4. 研究组蛋白共价修饰与基因表达的关系。

实验原理图



试剂盒组分

编号	名称	规格 12 rxns	规格 24 rxns	保存条件
【1】	Protein A/G beads	240 μL	480 μL	2~8℃
【2】	AB binding buffer	6 mL	12 mL	2~8℃
【3】	Binding enhancer ChIP	6 mL	12 mL	2~8℃
【4】	Nuclear extraction buffer	9 mL	18 mL	2~8℃
【5】	Protease inhibitor	180 μL	360 μL	-25~-18℃
【6】	IP lysis buffer B	21 mL	42 mL	2~8℃
【7】	Blocking Buffer ChIP	1.2 mL	2.4 mL	2~8℃
【8】	ChIP washing buffer	18 mL	36 mL	2~8℃
【9】	DNA extraction buffer	3 mL	6 mL	2~8℃
【10】	Proteinase K	180 μL	360 μL	-25~-18℃
【11】	Nucleic acid BF C	15 mL	30 mL	2~8℃
【12】	吸附柱	18 个	36 个	2~8℃
【13】	IgG	12 μL	24 μL	-25~-18℃

注：一次标准的免疫沉淀实验（实验分组：Input、IP 组及 IgG 组），需消耗 2 rxns 试剂量。

*若因实际实验分组设计改变（比如不设置阴性对照 IgG 组，或设有复数的 IP 组时），可能会导致试剂盒组分使用量增加。

自备材料

自备仪器耗材	自备试剂
磁力架	目的蛋白抗体（IP 级）
研钵（组织样本使用）	液氮（组织样本使用）
低温离心机	1×PBS 缓冲液（RNase free）
超声波细胞破碎仪 （2～3mm 探头，600～800W 功率）	甲醛（浓度 37~40%）
垂直混匀器	甘氨酸
RNase free 离心管	RNase-Free ddH_2O
RNase free 枪头	/

实验操作

1. 抗体-Protein A/G 准备（时间 30 min）

1） 取 2 份 20μL【1】Protein A/G beads 置于离心管中（分别标示为 IP 及 IgG），磁力架收集磁珠并去除上清后，加入 400 μL 【2】AB binding buffer 及 100 μL 【3】Binding enhancer ChIP；

2） IP 组加入 2 μg 目的蛋白抗体，IgG 组加入 2 μL 【13】IgG 抗体，轻弹混匀后室温摇动孵育 30 min；

3） IP 和 IgG 分别在磁力架收集磁珠并去除上清；

4） IP 和 IgG 分别加入 50 μL 【2】AB binding buffer 轻弹混匀后，磁力架上收集磁珠并去除 30 μL 上清。

注意事项：

a）吸取【1】Protein A/G beads 前需要充分颠倒混匀；

b）磁力架自备；

c）抗体要求为 IP 级别；

d）室温孵育期间，间隔 5 min 轻弹混匀样品。

2. 细胞交联（时间 0.5 h）

1） **新鲜细胞**：收集 1×10^7 细胞，1×PBS 洗涤两次，最后一次吸干残余 PBS；**组织**：称取 0.1～0.2 g 组织，使用液氮充分研磨成单细胞状态，转移细胞粉末到离心管中；

2） 细胞沉淀依次加入 1.5 mL 1×PBS 和 40 μL 甲醛，充分重悬细胞后，室温交联 5 min；

3） 称取并加入 0.05 g 甘氨酸，充分颠倒混匀并室温中和 1 min 后，1000 rpm 室温离心 5 min 去除上清；

4) 加入 1.5 mL 【4】Nuclear extraction buffer 及 15 μL 【5】Protease inhibitor 悬浮细胞并室温裂解 10 min 后，5000 rpm 室温离心 5 min 去除上清。

注意事项：

a）甲醛浓度为 37~40%；

b）每次洗涤需要充分去除干净残余 PBS；

c）经交联处理的细胞可以放置于-80℃暂存。

3. 细胞裂解（时间 1 h）

1）细胞核沉淀中加入 3.4 mL 【6】IP lysis buffer B 及 15 μL 【5】Protease inhibitor，充分吹打混匀；

2） 使用 2 ~ 3 mm 探头，600 ~ 800 W 功率，在冰浴条件 5 s ON、5 s OFF 超声破碎细胞 30 ~ 50 min 至澄清；

3） 转移 100 μL 超声样本至新离心管中（标示为 Input）；

注意事项：

a）当超声破碎产生泡沫时，可调整为 3 s ON、3 s OFF；

b）Input 样品无需离心及免疫富集，直接跳转至 DNA 回收步骤；免疫富集期间可暂存于-25 ~ -18℃；

c）【3】Binding enhancer ChIP 试剂每次使用前需 37℃加热溶解。

4. 免疫富集（时间 1.5h）

1）剩余超声样本 4 ℃ 12000 rpm 离心 10min 后，上清平均分配至 IP 及 IgG 管中；

2）体系中加入 100 μL【7】Blocking Buffer ChIP，充分吹打混匀后，继续加入 400 μL 【3】Binding enhancer ChIP，在垂直混匀器上继续室温摇动孵育 1h 后，在磁力架上收集磁珠并去除上清；

3） IP 和 IgG 管分别加入 500 μL 【8】ChIP washing buffer 在垂直混匀器上室温摇动洗涤 5 min，在磁力架收集磁珠并去除上清，重复本步骤 2 次（共洗涤 3 次）。

注意事项：

a）每次洗涤充分去除洗液；

b）本文室温是指 20 ~ 37℃，如超出此范围建议在恒温摇床中孵育；

c）磁力架收集磁珠时间约 30s。

5. DNA 回收（时间 2.5h）

1） IP 及 IgG 磁珠中分别加入 200 μL 【9】DNA extraction buffer，37℃洗脱 5 min 后磁力架上转移上清至新离心管中；Input 只加入 100 μL 【9】DNA extraction buffer；

2） IP、IgG 及 Input 继续加入 10 μL 【10】Proteinase K，吹打混匀后 55℃孵育 2 h；

3） 继续加入 400 μL 【11】Nucleic acid BF C 颠倒混匀后转移至【12】吸附柱中，12000 rpm 室温离心 1 min，弃穿透液；

4） 吸附柱中加入 400 μL 【11】Nucleic acid BF C，12000 rpm 室温离心 1 min，弃穿透液；

5） 吸附柱中不加入任何试剂，12000 rpm 室温离心 1 min 后，弃穿透液；

6） 将吸附柱置于新离心管中，加入 30 μL ddH_2O，12000 rpm 室温离心 1 min，穿透液为各组别产物。

注意事项：

a） DNA 样品-25～-18℃保存待用，可用于 qPCR 或 NGS。

扫码可下载 ChIP-qPCR 计算模板

扫一扫，了解更多

广州吉赛生物科技股份有限公司

Guangzhou Geneseed Biotech Co.,Ltd.

Tel:400-8989-400 E-mail: geneseed@geneseed.com.cn