



# PureBinding<sup>®</sup> 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

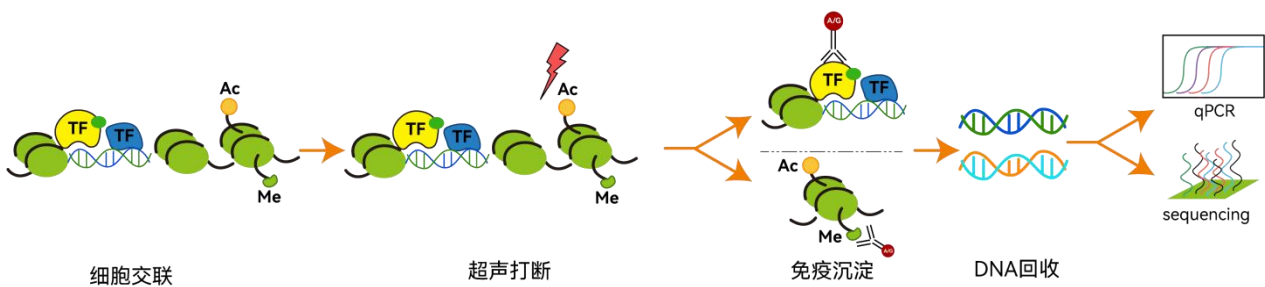
转录是遗传信息从 DNA 到 RNA 传递的关键步骤，也是 RNA 生物合成的最主要形式。转录因子 (transcription factor) 是一类能与基因 5'端特定序列专一性结合，使目的基因以特定的强度在特定的时间与空间表达的蛋白质分子，是参与转录调控的关键因素之一。

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	540 $\mu$ L	1.08mL	2 ~ 8 $^{\circ}$ C
【2】	Clean beads	120 $\mu$ L	240 $\mu$ L	2 ~ 8 $^{\circ}$ C
【3】	DNA extraction buffer	3mL	6mL	2 ~ 8 $^{\circ}$ C
【4】	Binding enhancer ChIP	6mL	12mL	2 ~ 8 $^{\circ}$ C
【5】	AB binding buffer	6mL	12mL	2 ~ 8 $^{\circ}$ C
【6】	Nuclear extraction buffer	9mL	18mL	2 ~ 8 $^{\circ}$ C
【7】	IP lysis buffer B	21mL	42mL	2 ~ 8 $^{\circ}$ C
【8】	ChIP washing buffer	18mL	36mL	2 ~ 8 $^{\circ}$ C
【9】	Nucleic acid BF C	15mL	30mL	2 ~ 8 $^{\circ}$ C
【10】	吸附柱	18 个	36 个	2 ~ 8 $^{\circ}$ C
【11】	IgG	12 $\mu$ L	24 $\mu$ L	-25 ~ -18 $^{\circ}$ C
【12】	Protease inhibitors	180 $\mu$ L	360 $\mu$ L	-25 ~ -18 $^{\circ}$ C
【13】	Proteinase K	180 $\mu$ L	360 $\mu$ L	-25 ~ -18 $^{\circ}$ C

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 $\times$ 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 <sub>2</sub> O
RNase free 枪头	/



## 实验操作

### 1. 抗体-Protein A/G 准备 (时间 30 min)

- 1) 取 2 份 40  $\mu\text{L}$  【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  $\mu\text{L}$  【5】 AB binding buffer 及 100  $\mu\text{L}$  【4】 Binding enhancer ChIP;
- 2) IP 组加入 2  $\mu\text{g}$  目的蛋白抗体, IgG 组加入 2  $\mu\text{L}$  【11】 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  $\mu\text{L}$  【5】 AB binding buffer 轻弹混匀后, 磁力架上收集磁珠并去除 30  $\mu\text{L}$  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  $1 \times 10^7$  细胞,  $1 \times \text{PBS}$  洗涤两次, 最后一次吸干残余 PBS; **组织**: 称取 0.1~0.2g 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  $1 \times \text{PBS}$  和 40  $\mu\text{L}$  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 【6】 Nuclear extraction buffer 及 15  $\mu\text{L}$  【12】 Protease inhibitors 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  $-80^\circ\text{C}$  暂存。



### 3. 细胞裂解 (时间 1 h)

- 1) 细胞核沉淀中加入 3.4 mL 【7】 IP lysis buffer B 及 15  $\mu$ L 【12】 Protease inhibitors, 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  $\mu$ L 超声样本至新离心管中 (标示为 Input) ;
- 4) 剩余超声样本中加入 800  $\mu$ L 【4】 Binding enhancer ChIP, 吹打混匀并按照每管 2 mL 分配至 2 支新离心管中, 4°C 12000 $\times$ g 离心 10 min 后转移上清至新离心管;
- 5) 继续加入 10  $\mu$ L 【2】 Clean beads, 室温摇动孵育 20 min 后, 磁力架上分别转移上清至 IP 及 IgG 管中。

#### 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;
- c) 【4】 Binding enhancer ChIP 试剂每次使用前需 37°C 加热溶解。

### 4. 免疫富集 (时间 1.5h)

- 1) IP 和 IgG 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;
- 2) IP 和 IgG 分别加入 500  $\mu$ L 【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) 室温是指 20 ~ 37°C, 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  $\mu$ L 【3】 DNA extraction buffer, 65°C 热洗脱 5 min 后磁力架上转移上清至新离心管中; Input 只加入 100  $\mu$ L 【3】 DNA extraction buffer;
- 2) IP、IgG 及 Input 继续加入 10  $\mu$ L 【13】 Proteinase K, 吹打混匀后 55°C 孵育 2 h;
- 3) 继续加入 400  $\mu$ L 【9】 Nucleic acid BF C 颠倒混匀后转移至 【10】 吸附柱中, 12000 rpm 室温离心 1 min 弃穿透液;
- 4) 吸附柱中加入 400  $\mu$ L 【9】 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  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O，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 $^{\circ}$ C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](mailto:geneseed@geneseed.com.cn)