



Sonication CHIP Kit

RK20258



www.abclonal.com

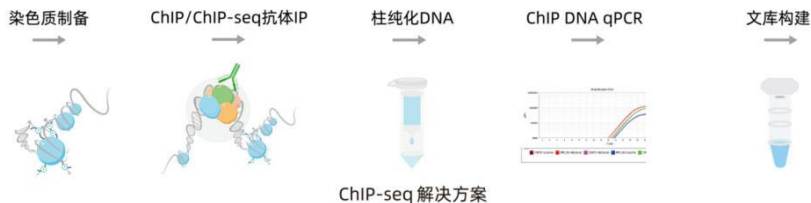
Version: N16F27V3.1

目录

1. 产品概述	1
2. 试剂盒组成	3
3. 保存方式与运输条件	4
4. 使用条件	4
5. 其他自备材料	4
6. 工作原理	5
7. 注意事项	6
8. 操作步骤	8
9. 附录	20

1. 产品概述

ABclonal 开发了 ChIP-seq 全流程解决相关产品，其中包括 ChIP 试剂盒、ChIP/ChIP-seq 级别的抗体、ChIP DNA 纯化试剂盒、ChIP DNA qPCR 检测试剂、ChIP DNA 文库构建试剂盒，可为研究者提供一体化的 ChIP-seq 实验解决方案。



Sonication ChIP Kit 是一款用于染色质免疫沉淀 (Chromatin immunoprecipitation, ChIP) 实验的试剂盒，是 ChIP 全流程解决方案中的一个重要环节。

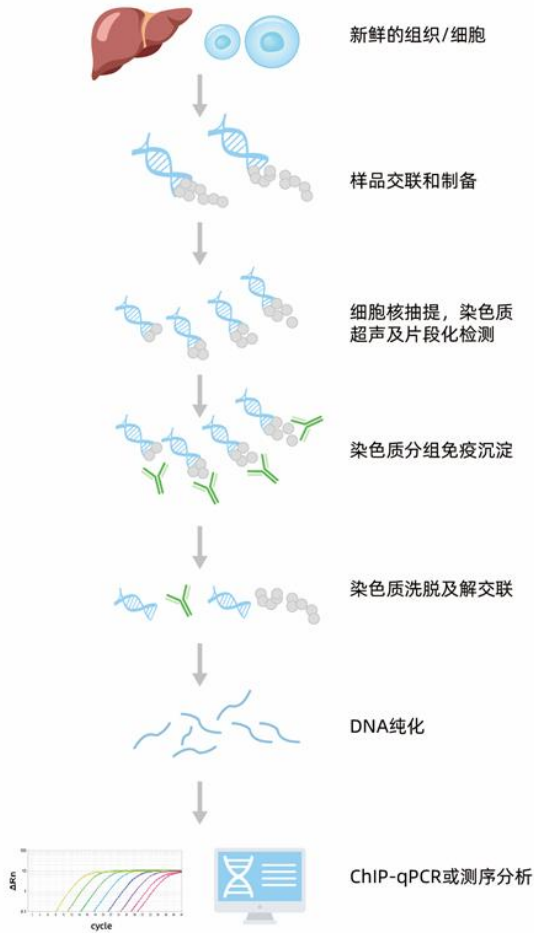
主要实验步骤包括：

- 1) 样品制备与交联：在合适的条件下处理好样本，使用终浓度为 1% 的甲醛进行交联，同时准备好阳性对照和阴性对照样本；
- 2) 细胞核抽提和染色质超声破碎：加入 Cell Swelling Buffer 裂解细胞，再加入 ChIP Sonication Buffer 进行超声处理；
- 3) 分析染色质片段化情况及浓度 (推荐必做质控步骤)：将超声后的样本取出 50 μ L，提取 DNA 并进行质检；
- 4) 染色质免疫沉淀 (IP)：每份超声后的样本取出 5% 的样本作为 Input，再向剩余的超声处理的样本加入目的蛋白抗体，同时向阳性对照样本中加入 H3 抗体，阴性对照样本中加入 IgG 抗体进行 IP 反应；
- 5) 染色质洗脱并解交联：向 IP 后的样本中加入 ChIP 洗脱缓冲液，进行解交联；

6) 离心柱纯化 DNA: 参照说明书, 对解交联后的 DNA 进行抽提;

7) qPCR 定量分析 ChIP 实验结果: 按照常规 qPCR 程序进行检测, 同时加上 Input 组, 阳性对照组, 阴性对照组及空白对照组。

试剂盒内组分均经过严格的质量控制, 保证产品稳定性和可重复性。



染色质免疫沉淀(Chromatin immunoprecipitation, ChIP)流程图

2. 试剂盒组成

试剂盒 模块	试剂管名称	8 次	24 次	保存 条件
	Glycine Solution (10X)*	1.5 mL	10 mL	4°C
	Cell Swelling Buffer (10X)	1.8 mL	5.3 mL	4°C
	ChIP Sonication Buffer (10X)	1.5 mL	4.3 mL	4°C
	ChIP Low Salt Wash Buffer (10X)	1.8 mL	5.7 mL	4°C
Box A	ChIP High Salt Wash Buffer (5X)	1.8 mLX2	10 mL	4°C
	LiCl Buffer (5X)	1.8 mL	5.3 mL	4°C
	TE Buffer (100X)	200 µL	580 µL	4°C
	ChIP Elution Buffer	1.4 mLX2	8 mL	4°C
	5 M NaCl	200 µL	700 µL	4°C
	1 M DTT	32 µL	100 µL	-20°C
	Proteinase K (20 mg/mL)	64 µL	210 µL	-20°C
	RNase A (10 mg/mL)	64 µL	210 µL	-20°C
Box B	Human RPL30 Exon2 Primers (5 µM)	40 µL	160 µL	-20°C
	ChIP-grade Histone H3 antibody (1 mg/mL)*	10 µL	20 µL	-20°C
	IgG (1 mg/mL)*	10 µL	20 µL	-20°C

*, 注： 1. 这三个试剂提供的量仅供测试用，不是 8 或 24 次的足量，如需更多，可自行采购。

2. 对照抗体不要反复冻融超过 10 次。

3. 请严格按照存放条件保存试剂，以防影响实验效果。

3. 保存方式与运输条件

运输与保存: Sonication ChIP Kit 建库试剂盒分为 Box A 和 Box B, Box A 冰袋运输, 保存于 4°C; Box B 干冰运输, 保存于 -20°C。在合适的保存条件下, 1 年有效期内试剂盒的试剂与酶组分能够保持完整活性。

4. 使用条件

产品操作: 使用前, 尽量保证各试剂溶液完全融解充分无沉淀, 瞬时离心至管底部。试剂盒溶液组分可以在室温下进行充分融解。使用时, Box A 组分放于室温, Box B 组分放置在冰上。产品组分使用完后, 请尽快放置于合适条件下进行保存。

5. 其他自备材料

磁力架

ChIP 级蛋白 A/G (Protein A/G, 1:1) 磁珠(RM02915)

蛋白酶抑制剂混合物 PIC (100X) (RM02916)

甲醛 (16%)

甘氨酸

乙醇 (96-100%) (80%乙醇需要现配现用)

1X PBS

无核酸酶水(ddH₂O)

DNA 纯化试剂盒(推荐 ABclonal AFTSpin 多功能 DNA 回收纯化试剂盒(RK30100))

qPCR mix(推荐 ABclonal Genius 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (RK21204))

目的蛋白 ChIP 级别抗体 (详见 ABclonal 官网)

6. 工作原理



7. 注意事项

7.1 样品类型及样品量

组织样品：每个标准的 ChIP 反应需要约 25 mg 组织样品处理后获得的染色质。当收取组织样品进行 ChIP 实验时，要尽量去除脂类，以及坏死等无关组织。组织样品建议立即进行交联处理。在实际工作当中，我们建议每次实验处理足量的组织，可满足后续多个免疫沉淀反应和技术性重复要求，如单次 ChIP 实验应包含与阴性对照 (IgG)，阳性对照 H3 抗体和目的蛋白抗体等进行免疫沉淀的足量样品。建议以一个样品组为标准，准备约 100 到 150 mg 组织样品 (每个样品组能满足同时进行目的蛋白抗体、阴性对照 IgG、阳性对照 H3 抗体等多个 ChIP 反应的用量)。

细胞样品：每个标准的 ChIP 反应需要约 4×10^6 个细胞处理后获得的染色质。在实际工作当中，我们建议每次实验处理足量的细胞用于满足后续多个免疫沉淀反应和技术性重复要求，如单次 ChIP 实验应包含与阴性对照 (IgG)、阳性对照 H3 抗体和目的靶标蛋白抗体等进行免疫沉淀的足量样品。以一个样品组为标准，准备约为 1×10^7 到 2×10^7 细胞 (以 293T 细胞为例，一般情况下，大约对应于细胞生长汇合度在 80-90% 的 2-3 个 10 cm 培养皿的细胞)。

7.2 对照抗体和内参引物

试剂盒提供阴性对照抗体(兔 IgG 抗体)、阳性对照抗体(组蛋白 H3 ChIP 级抗体)，及 RPL30 基因引物。组蛋白 H3 可以与基因组中大多数 DNA 序列结合，包括 RPL30 位点，而 IgG 抗体不会与任何 DNA 结合，我们可以使用 qPCR 方法检测基因富集程度和实验是否成功。

PRL30 引物是针对 human RPL30 基因的 2 号 exon 设计，序列信息如下：

Primer 名称	序列(5'to3')	碱基数 (bp)
Human RPL30 Exon2 Primer-F (100 μ M)	CCTCACTCACCGTCTCTTTG	21
Human RPL30 Exon2 Primer-R (100 μ M)	TTGCGGGTTGCCATTTGT	18

7.3 超声条件摸索

建议在开展正式实验前，先进行预实验，以熟悉实验体系和了解并优化所用样本的各项条件。为了细胞计数，可额外准备一盘细胞用于血球计数板法测定细胞数。**预实验时，需要额外准备一个细胞样品组，对染色质剪切效率和浓度进行检测。**超声条件需根据**超声仪器**的超声功率和超声间隔时间等进行优化：一般来说，优化后的超声条件需要能够将**60%到90%的染色质片段随机打断到1kb以下**。

- 使用接触式探头超声仪进行超声破碎：建议使用 3 mm 或 2 mm 直径微探头，设置 50% 以下振幅(需要摸索)，超声 2 s，间隔 2 s 的超声循环(使用者也可以根据自身需要设定每次超声的时间、间隔时间和循环次数)，事先摸索超声条件和运行时间。然后根据摸索好的超声条件和时间进行染色质样品超声破碎，可获较理想的染色质片段化样品。在超声过程中，需保持样品一直处于冰上低温状态。不要使探头接触超声管底部或管壁，如超声过程产生泡沫，需暂停超声并调整超声管位置。
- 使用非接触式(循环降温冰水浴)超声仪进行超声破碎：根据仪器说明书，根据待超声样品体积设定合适功率(一般 500 μ L 以下样品，功率可以设定在 50-100 W 之间)，设定合适的超声循环和总运行时间。同样建议每次 ChIP 超声实验前，针对不同样品预先摸索超声条件和超声时间，可以做几个运行时间梯度(如 1min, 2min, 3min, 4min, 5min...)。一次超声(on)的时间，建议 10 s 以内，间隔时间通常建议不少于 10 s。有一个参考条件：超声 10 s，间隔时间 20 s，运行总时间：12 min(对应于 1×10^7 细胞样品)。
- 延长样品交联时间或交联温度过高，会显著降低染色质超声破碎效率。另外，过度超声会破坏染色质上抗原表位，导致抗体富集效率降低引起的 ChIP 扩增信号下降等问题。因此，我们建议用超声处理样品时，使用可得到理想染色质片段的最少超声循环数即可。如果发现延长超声时间，也始终无法达到理想的破碎后染色质范围，建议重新制备样品。

8. 操作步骤

1. 细胞样品交联与制备

实验前准备（客户自备相关材料）

试剂	配制方案
Glycine Solution (10X)*	将 112.600g 甘氨酸 (glycine) 用 1L 去离子水溶解得到 1.5 M 甘氨酸溶液 (10X);
1X PBS Buffer (PBS)*	10 mmol/L Na ₂ HPO ₄ ; 1.75 mmol/L KH ₂ PO ₄ ; 137 mmol/L NaCl; 2.65 mmol/L KCl; pH 7.2-7.6
1% 甲醛溶液*	用 1X PBS 新鲜配制终浓度为 1% 的细胞固定液; 一般试剂盒标配为 16% 的不含甲醇的甲醛溶液 (可根据比例折算需要加的体积), 甲醛溶液置于室温, 确保新鲜未过期。
PBS+PIC*	2 mL 1X PBS Buffer + 20 μ L 100X PIC (确保蛋白酶抑制剂混合物 PIC (100X)完全溶解)。

*，注：甲醛溶液，1X PBS，Glycine Solution (10X)需要客户自备；PIC 试剂使用时再加入。

实验步骤

正文提供了贴壁细胞和悬浮细胞样品交联处理流程，组织样品处理流程详见附件 9.3。

1.1 贴壁细胞：

1.1.1 培养好的细胞 (2×10^7)，弃去培养基后用预冷的普通 1X PBS 5 mL 漂洗细胞两次，每次彻底弃净 PBS。

1.1.2 为了使蛋白与 DNA 交联，向每个培养皿加入新鲜配好的细胞固定液 (终浓度为 1% 的含甲醛的 PBS) 10 mL 后，室温 (15-25°C 为宜) 放置 10 min。

备注：不要在高于 25°C 的环境内固定。

1.1.3 在每个培养皿中加入 1 mL 10X Glycine Solution 稍加转动使之混匀，室温孵育 5 min，来终止上述固定反应。

1.1.4 每个培养皿的细胞加入 2 mL 预冷的含 PIC 的 1X PBS，将细胞刮下，并将所有刮下来的固定后细胞收集到一个 15 mL 的锥底离心管中。

1.1.5 4°C，1,000 g 离心 5 min 收集细胞，去除上清。

备注：此处可暂停实验，吸干上清后的细胞样品可保存在-80°C 冰箱。

1.1.6 若继续实验，每 2×10^7 细胞重悬于 1 mL 1X Cell Swelling Buffer +PIC，立即进行后续的细胞核抽提和染色质超声破碎步骤 (见步骤 2)。

1.2 悬浮细胞：

1.2.1 根据培养基体积折算需要加入的 16% 甲醛的体积。然后加入折算体积的 16% 甲醛，混匀后直接在室温进行固定，如培养基 5 mL，加入 330 μ L 16% 甲醛，边加边混匀，室温 (15-25°C 为宜) 放置 10 min。

备注：加入甲醛前，确保培养基恢复到室温，千万不可立刻加入甲醛。

1.2.2 在每个培养皿中加入终浓度为 1X Glycine Solution 稍加转动使之混匀，室温孵育 5 min，来终止上述固定反应。

1.2.3 收集固定后的细胞到 50 mL 锥底离心管中，4°C，1,000 g 离心 5 min 沉淀细胞后，用预冷的 PBS 漂洗两次。

1.2.4 4°C，1,000 g 离心 5 min 收集细胞，去除上清。

备注：此处可暂停实验，吸干上清后的细胞样品可保存在-80°C 冰箱。

1.2.5 若继续实验，每 2×10^7 细胞重悬于 1 mL 1X Cell Swelling Buffer+PIC 中，立即进行后续的细胞核抽提和染色质超声破碎步骤 (见步骤 2)。

2. 细胞核抽提和染色质超声破碎

备注：以下的操作流程所需的试剂用量是针对一个样品组 (100 到 150 mg 组织，或 1×10^7 到 2×10^7 细胞) 给出所需试剂用量。我们建议同一样品组内的多管样品 (用于不同抗体的 ChIP 沉淀反应需要) 染色质处理过程可合并至一管进行，这有利于得到均一的染色质超声片段，使用者需根据每组需要的 ChIP 反应总数调整试剂用量。

实验前准备

配制细胞裂解缓冲液

试剂	体积
● Cell Swelling Buffer(10X)	200 μ L
100X PIC*	20 μ L
● DTT	2 μ L
ddH ₂ O	1.8 mL
总体积	约 2 mL

配制 ChIP 超声缓冲液

试剂	体积
● ChIP Sonication Buffer (10X)	100 μ L
100X PIC*	10 μ L
● DTT	1 μ L
ddH ₂ O	0.9 mL
总体积	约 1 mL

*，注：100X 蛋白酶抑制剂混合物 PIC 需要客户自备，并确保 PIC 完全溶解。PIC 试剂，DTT 使用时再加入。

实验步骤

2.1 使用 1 mL 预冷的细胞裂解缓冲液重悬细胞，冰上孵育 10 min，每 3 min 颠倒混匀一次。

2.2 4°C，5,000 g 离心 5 min 以沉淀细胞核，去掉上清。

2.3 再次用 1 mL 预冷的 细胞裂解缓冲液重悬细胞，冰上孵育样品 5 min。

2.4 4°C，5,000 g 离心 5 min 以沉淀细胞核。用 1 mL 或 500 μ L ChIP 超声缓冲液将细胞核沉淀再次重悬，冰上孵育 10 min。

2.5 最终将此样品转移到一个适宜超声的离心管中。

备注：交联的组织或细胞样品可能仍处于非完全裂解状态，直到超声处理才能完全释放染色质。

超声仪类型	建议使用离心管	建议超声体积 (μ L)
接触式探头超声仪	2 mL 体积离心管	500-1000
非接触式超声仪	1.5 mL 体积离心管	300-500
	0.2 mL 体积离心管	50-150

注意：超声体积过大或浓度过高，会导致染色质片段化效率降低。有实验室为了追求效果，会将一个样品分成多管超声后再合并进行后续实验。(详见注意事项 7.3)

2.6 超声处理染色质片段(需要实验室根据自己仪器及样品进行摸索)。

2.7 超声破碎完成后，4°C，12,000 g 离心 10 min，除去样品中的细胞核碎片和其他不溶物。

2.8 将上清转移到一个新管子中，即为交联的染色质样品，充分混匀后取 50 μ L 染色质样品用以分析 DNA 分子量分布范围并确定其浓度 (参照步骤 3)，其他剩余染色质样品在下一步正式进行 IP 步骤前需要保存在-80°C 冰箱。

3. 分析染色质片段化情况及浓度 (推荐必做质控步骤)

3.1 向来自步骤 2.8 的 50 μL 染色质样品添加 100 μL 无核酸酶的水, 补足到 150 μL , 然后加入 6 μL 5 M NaCl 和 2 μL RNase A, 涡旋震荡混匀, 37°C 孵育 30 min。

3.2 向 RNase A 消化后的样品中加入 2 μL Proteinase K, 涡旋震荡混匀, 65°C 孵育至少 2 hr。

3.3 加入等体积的异丙醇溶液, 振荡混匀。

3.4 利用离心柱式 DNA 纯化试剂盒说明书进行 DNA 样品纯化后(参照步骤 6 操作), 取 10 μL 样品与 DNA marker 同时进行 1% 琼脂糖凝胶电泳以确定 DNA 片段大小。如果后续 ChIP 后 DNA 通过测序进行分析, 理想的染色质需要有约 60-90% DNA 分子量范围在 200-500 bp; 如果后续 ChIP 后 DNA 仅用于 qPCR 分析, 可以适当放宽上述条件。

3.5 用 DNA 浓度测定仪 (如 Nanodrop) 测定纯化后 DNA 浓度, 理想的 DNA 浓度应当在 50-200 ng/ μL 之间。

4. 染色质免疫沉淀 (IP)

为了得到理想的 ChIP 结果, 每个 IP 管中必须含有足够多的 DNA, 组蛋白 5-10 μg DNA/IP, 转录因子 10-20 μg DNA/IP, 大约来自 4×10^6 细胞或 25 mg 组织产生的染色质片段。一般在与抗体孵育前, 需要向第二部分获得染色质的样品中添加 1X ChIP Sonication Buffer +PIC 到 500 μL (默认一般 IP 体积)。

Group1 为一组样品, 分别为实验组(2 个目的蛋白), 阴性对照组, 阳性对照组, 需要做 4 个 IP;

Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Input #1	Input #2	Input #3	Input #4
Tube for IgG (negative ctrl)	Tube for IgG (negative ctrl)	Tube for IgG (negative ctrl)	Tube for IgG (negative ctrl)
Tube for Target protein Ab 1	Tube for Target protein Ab 1	Tube for Target protein Ab 1	Tube for Target protein Ab 1
Tube for Target protein Ab 2	Tube for Target protein Ab 2	Tube for Target protein Ab 2	Tube for Target protein Ab 2
H3 Ab (positive ctrl)	H3 Ab (positive ctrl)	H3 Ab (positive ctrl)	H3 Ab (positive ctrl)

实验前准备（单个 IP 样品试剂）

预备试剂	使用说明
100X 蛋白酶抑制剂混合物 PIC*	确保 PIC 完全溶解
ChIP 级蛋白 A/G 磁珠*	

*注：需要客户自备。PIC 试剂， DTT 使用时再加入。

配制 ChIP 超声缓冲液(1X)

试剂	体积
● ChIP Sonication Buffer (10X)	100 μL
100X PIC*	10 μL
● DTT	1 μL
ddH2O	0.9 mL
总体积	约 1 mL

配制低盐漂洗液(1X)

试剂	体积
○ ChIP Low Salt Wash Buffer (10X)	100 μL
ddH2O	0.9 mL
总体积	约 1 mL

配制高盐漂洗液(1X)

试剂	体积
○ CHIP High Salt Wash Buffer (5X)	200 μ L
ddH ₂ O	0.8 mL
总体积	约 1 mL

配制 LiCl 漂洗液(1X)

试剂	体积
○ LiCl Buffer (5X)	200 μ L
ddH ₂ O	0.8 mL
总体积	约 1 mL

配制 TE 缓冲液(1X)

试剂	体积
○ TE Buffer (100X)	20 μ L
ddH ₂ O	2 mL
总体积	约 2 mL

实验步骤

➤ 抗体与靶标蛋白孵育

4.1 在每个 IP 反应管加入等量交联后的染色质样品 (10-15 μ g 回收后纯化 DNA 对应体积的交联染色质, 来自步骤 2.8), 并用 1X ChIP Sonication Buffer (ChIP 超声缓冲液)+PIC 补至总体积为 500 μ L。

4.2 将稀释后的 ChIP 染色质, 每个样品管吸取 25 μ L 样品并转移到一个新的离心管中, 作为 5% 样品输入 (Input) 对照, 不进行免疫沉淀反应, 可以暂时保存在 -20°C 冰箱 (Input 样品后续会在步骤 5.1 取出, 与其他沉淀反应后染色质样品同步进行后续操作)。

4.3 在各个目的蛋白样品管中加入对应抗体，在各个对应阴性对照管中加入正常同型 IgG。每种抗体用量需根据相关抗体说明书及浓度进行添加，每个沉淀反应所需对应抗体量为 2-5 μg ，在转子上 4°C 条件孵育至少 3 hr (不建议过夜)。

备注：ChIP 实验中，抗体用量很关键，过多或过少的抗体都会对靶标富集度造成负面影响。

➤ Protein A/G 磁珠预处理

4.4 预处理磁珠：轻微重悬混匀 ChIP 级 Protein A/G 磁珠，取 30 μL 磁珠 (为方便吸取，可在吸取磁珠前将 100 μL 枪头前端剪去小部分使用)，加入 200 μL 1X ChIP Sonication Buffer+PIC，混匀后将离心管放在磁性分离架上，将 Protein A/G 磁珠吸附至管壁。等 1-2 min 溶液澄清后，小心地将上清吸走。

(如磁珠非特异性吸附较强可继续以下操作：加入 200 μL 3% BSA 溶液 (TE 缓冲液配制)置于转子上 4°C 条件孵育 1 hr。孵育完成后加入 200 μL 1X ChIP Sonication Buffer +PIC 清洗磁珠 2 次。)

➤ 抗体-靶标蛋白复合物与 Protein A/G 磁珠孵育

4.5 将步骤 4.3 反应液 10,000 g 离心 10 s，吸取全部反应液加入到对应标记的已预处理 Protein A/G 磁珠管中，重新封严管子，在转子上 4°C 条件孵育 2 hr。

4.6 将离心管放在磁性分离架上，将 ProteinA/G 磁珠吸附至管壁。等 1-2 min 溶液澄清后，小心地将上清吸走。此上清可以暂时保留，以备查找问题时使用。

➤ 清洗 IP 复合物

4.7 加入 1 mL 低盐漂洗液，并将样品管从磁性分离架取下，在转子上 4°C 条件转动并孵育 5 min。重新把样品置于磁性分离架，等 1-2 min 溶液澄清后，小心地将上清吸走。

4.8 加入 1 mL 高盐漂洗液，并将样品管从磁性分离架取下，在转子上 4°C 条件转动并孵育 5 min。重新把样品置于磁性分离架，等 1-2 min 溶液澄清后，小心

地将上清吸走。

4.9 当通过预实验发现抗体非特异性吸附较强时，可以在此步加入 1 mL LiCl 漂洗液，并将样品管从磁性分离架取下，在转子上 4°C 条件转动并孵育 5 min 后，重新把样品置于磁性分离架，等 1-2 min 溶液澄清后，小心地将上清吸走。

4.10 加入 1 mL TE 缓冲液，并将样品管从磁性分离架取下，不用孵育，涡旋振荡后重新把样品置于磁性分离架，等 1-2 min 溶液澄清后，小心地将上清吸走。

4.11 重复步骤 4.10 一次，即 TE 缓冲液清洗两遍。

4.12 立即进入步骤 5 染色质洗脱流程。

5. 染色质洗脱并解交联

实验前准备

从冰箱中取出并在 37°C 水浴中预热 ChIP Elution Buffer，并确认 SDS 已完全溶解。将水浴锅或温控混匀器设定到 65°C。

实验步骤

5.1 取 125 μ L ChIP Elution Buffer 分别加入到每组对应的 5% 样品输入对照 (5% Input) 管中，室温放置直到 5.7 步骤。

5.2 在其他每管 ChIP 免疫沉淀样品中分别加入 150 μ L ChIP Elution Buffer。

5.3 将加入 ChIP Elution Buffer 的 ChIP 免疫沉淀样品在 65°C 孵育 30 min，中间可每隔 5 min 用涡旋混合器轻轻震荡 (1,200 rpm)，将染色质从抗体-Protein A/G 磁珠上洗脱下来。此步用金属温控振荡器 (即带有振荡功能的金属浴) 效果最好。另外，洗脱也可以在室温下的转子上进行，但洗脱效果可能不如温控振荡器完全。

5.4 10,000 g 离心 10 s 收集离心管盖子上的残留样品。

5.5 将离心管放在磁性分离架上吸附 Protein A/G 磁珠，等 1-2 min 使溶液澄清。

5.6 小心地将每个样品管中洗脱下来的染色质上清转移到一个新的离心管中，

并分别标记。

5.7 在所有管中, 包括第一步的 5%样品输入对照 (5% Input) 管, 都加入 6 μL 5 M NaCl 和 2 μL RNase A, 37°C 孵育 30 min, 再加入 2 μL Proteinase K, 并在 65°C 孵育 4 hr 或过夜。

5.8 取出所有样品管, 恢复至常温后, 可直接进入步骤 6, 或者可保存样品在-20°C 冰箱, 暂停操作。为了避免在低温形成沉淀, 在步骤 6 进行 DNA 纯化前, 需确保样品恢复室温。

6. 离心柱纯化 DNA

本部分采用 ABclonal AFTSpin 多功能 DNA 回收纯化试剂盒(RK30100), 如使用其他产品请参考相应厂家说明书。

备注: 150 μL 体系中加入 150 μL 异丙醇充分混匀。

6.1 上一步产物(300 μL), 加入 750 μL Buffer DB, 充分混匀。

6.2 取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中, 吸取 100 μL Buffer BL 至柱子中。13,000 rpm 离心 1 min, 倒掉收集管中废液, 将吸附柱子重新放回收集管。

备注: 请使用当天处理过的柱子。

6.3 Buffer BL 预处理吸附柱后, 将上一步所得溶液加入吸附柱中(吸附柱放入收集管中), 室温放置 1 min, 12,000 rpm 离心 30-60 s, 倒掉收集管中的废液。

6.4 加入 600 μL Buffer WB (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 30 s, 弃掉废液。

6.5 加入 600 μL Buffer WB, 12,000 rpm 离心 30 s, 弃掉废液。

6.6 将吸附柱 SC1 放回空收集管中, 12,000 rpm 离心 2 min, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

6.7 取出吸附柱 SC1, 放入一个干净的离心管中, 在吸附膜的中间部位加入 50 μL Buffer EB(洗脱液事先在 65-70°C 水浴中加热效果更好), 室温放置 2 min, 12,000 rpm 离心 1 min。如果需要较多量 DNA, 可将得到的溶液重新加入吸附柱中, 离心 1 min。

6.8 将每个管子中的吸附柱 SC1 取出并丢弃，离心管中的洗脱液即为纯化的 DNA。样品可保存在-20°C 冰箱。

6.9 纯化后的 DNA 用 Qubit 仪器进行浓度检测。

备注：样品可保存在-20°C 冰箱，此步骤可暂停实验。富集的靶标 DNA 可以继续下游 qPCR 或建库，详见染色质免疫沉淀测序 (ChIP-seq) 标准操作流程。

7. qPCR 定量分析 ChIP 实验结果

实验相关建议：

- 实验中使用带滤芯的枪头以尽可能减少污染的可能性。
- 设计阳性对照和阴性对照引物，用于质量控制，检测是否存在假阳性和假阴性结果。
- 建议使用热启动 Taq 聚合酶以减少产生非特异 PCR 产物的风险。
- PCR 引物的选择很关键。引物应尽可能按照下列标准来设计：

引物长度	20-24 个核苷酸
最佳 Tm 值	60°C 左右
最佳 GC 含量	50%
扩增片段长度	150—200 bp（用于常规 PCR） 80—160 bp（用于实时定量 PCR）
特异性	经过 NCBI primer blast 分析，特异性较高

qPCR 常规操作：

7.1 按样品数将合适数目的 PCR 管或 PCR 板做好标记。注意包括 5% 样品输入对照 (Input) 组，阳性对照 (组蛋白 H3 样品) 组，阴性对照 (正常兔 IgG 样品) 组，以及一个监控 DNA 污染的无 DNA 模板的空白组对照，其中 5% 样品输入对照 (Input) 组可进行一系列的梯度稀释 (不稀释, 1:5, 1:25, 1:125) 来建立一个标准曲线，检测扩增效率。

7.2 每管中加入 2 μ L 各自对应的 DNA 样品作为模板以及 6 μ L ddH₂O，即

Input 组需要加入稀释后的 Input DNA 样品作为模板，而其他反应管需要按照实验设计的分组，加入对应的 ChIP 沉淀后获得的 DNA 作为模板。

7.3 按每管 10 μL 2X PCR Mix+2 μL 引物(对)配制总管数对应的 PCR 总反应液，记住计算时多算两份以补偿分管时的体积损失。配好后，向每个 PCR 管中加入 12 μL 反应液混合物。

qPCR 加样体系：

试剂	体积
2X PCR Mix	10 μL
F+R Primer(5 μM)	2 μL
DNA(<50 ng)	2 μL
ROX	0.4 μL
ddH ₂ O	5.6 μL

qPCR 程序：

温度	时间	cycles
95 $^{\circ}\text{C}$	3 min	1
95 $^{\circ}\text{C}$	5 s	40
60 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
融解曲线	默认	

备注：以上为使用 ABclonal 公司 RK21204 qPCR mix 的体系和程序，如使用其他产品请参考对应产品说明书。

7.4 按照标准 qPCR 两步法程序(含熔解曲线反应时间)设置 qPCR 程序。

7.5 程序运行结束后，用 qPCR 仪自带的程序分析定量结果，或利用下列公式自行计算，根据实验结果进行 ChIP 富集效率的计算。

$$\text{Percentage of Input} = 5\% \times 2^{-(C[T] \text{ Input Sample} - C[T] \text{ IP Sample})}$$

9. 附录

1. 优化超声条件

备注：交联后的染色质样品需对超声条件进行优化，超声条件与细胞数量、超声体积、超声片段大小、超声仪设置的功率和累计超声时间等多种因素相关。因此，在正式开始批量 ChIP 实验前，我们强烈建议您首先对您所使用的细胞系(正常培养条件)的超声条件进行预先摸索。

我们建议超声体系为：重悬于 1 mL ChIP 超声缓冲液中的样品组(100 到 150 mg 组织，或 1×10^7 到 2×10^7 细胞)。如下为针对超声处理的优化步骤：

1.1 按照如上步骤 1 和步骤 2 的操作准备所需超声样品，在步骤 2.5 处停止，并开始如下操作。

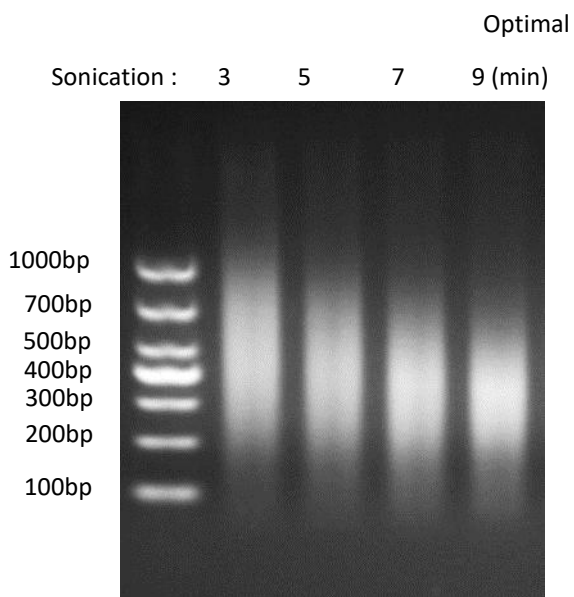
1.2 超声处理染色质样品：可以对超声仪器的超声功率和超声间隔时间等进行优化。

1.3 通过设定超声时间梯度实验，每个时间节点取出部分样品(剩余样品可继续超声)来确定不同超声时间的染色质剪切效果。一般最初摸索超声时间，累计超声时间每增加 1 min 设定 1 个检测节点为宜。

1.4 将上述所有时间节点收集的超声处理后的染色质，12,000 g，4°C 离心 10 min，获取染色质上清样品。

1.5 转移上清到新离心管，分别进行解交联(参考步骤 5)和 DNA 纯化(参考步骤 6)后，各取 20 μ L 样品，电泳检测 DNA 片段大小。

1.6 根据超声优化建议，选择适当大小的染色质片段样品进行后续实验。如果染色质片段过大或过小，则需调整仪器的超声功率和超声间隔时间等进行优化，操作同上。



参考图片：对交联 10 min 的 10^7 个 293T 细胞样品，分别进行 3, 5, 7 或 9 min 超声处理。

2. 常见问题及解决方案

问题	可能的原因	改进建议
所得超声后的染色质样品浓度过低	用于超声的细胞太少或者超声后细胞核没有完全裂解	如果染色质样品 DNA 浓度接近于 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，则增加染色质的加入体积使每个反应中的 DNA 含量达到 20 μg 。 在交联之前，对备用盘细胞计数确定实际所用的准确细胞数，并在超声处理前后用显微镜观察，确保细胞核已完全裂解。
	染色质片段化不够并且所得片段过长(大于 900 bp)	细胞被过度交联。交联处理时间超过 10 min 可能会抑制染色质消化。 缩短交联处理的时间为 10 min。
样品输入对照组没有 PCR 产物或很少产物	超声时，细胞太多或超声不充分	在交联之前，对备用盘细胞计数确定实际所用的准确细胞数。可参考附录 1 在实验前优化超声条件。
	PCR 反应所加 DNA 模板量不足或是 PCR 条件不合适	增加 PCR 反应中 DNA 模板量或扩增循环数。
阳性对照组蛋白 H3 抗体免疫沉淀组 RPL30	加入到免疫沉淀体系中的染色质太少或者染色质被过度片段化	参考问题 1 的改进建议。
	加入到免疫沉淀体系中的染色质太少，或者抗体加的太少，或者免	用于每个 IP 的染色质一般在 20 μg 为宜，抗体不少于 2 μg 。抗体与染色质孵育不少于 3 小时，加入 Protein A/G

基因 PCR 扩增没有条带	疫沉淀反应时间太短	磁珠后共孵育不少于 1 小时。
	染色质从 Protein A/G 磁珠上洗脱不完全	最佳的洗脱条件是将样品放在 65°C 并经常混匀使微球悬浮在溶液中。
阴性对照兔 IgG 免疫沉淀组和阳性对照组蛋白 H3 免疫沉淀组在 PCR 中得到相近量的产物	加入到免疫沉淀体系中的染色质或抗体太多	用于每个 IP 的染色质一般在 20 μg 为宜，抗体不少于 2 μg。染色质或抗体太多会导致背景很高。
	PCR 体系中模板 DNA 过多或 PCR 循环数过多	减少 PCR 体系中模板量或降低循环数。在 PCR 反应对数增长期分析结果非常重要，否则初始模板量的差异不能被精确检测。
实验抗体免疫沉淀组没有 PCR 产物	PCR 体系中 DNA 模板量不足	增加 PCR 反应中 DNA 模板量或扩增循环数。
	免疫沉淀体系中加入的抗体量不足	通常一个免疫沉淀反应需要的抗体量在 1 到 10 μg 之间。但是具体的用量因抗体而异。尝试增加免疫沉淀中的抗体量。
	所用抗体不适合免疫沉淀	更换经过验证的适于对应物种及 ChIP 应用的抗体。

3. 组织样品甲醛交联处理

实验前准备

试剂	配制方案
Glycine Solution(10X)*	将 112.600g 甘氨酸 (glycine) 用 1L 去离子水溶解得到 1.5 M 甘氨酸溶液 (10X)
1X PBS Buffer(PBS)*	10 mmol/L Na ₂ HPO ₄ ; 1.75 mmol/L KH ₂ PO ₄ ; 137 mmol/L NaCl; 2.65 mmol/L KCl; pH 7.2-7.6
PBS+PIC*	3 mL 1X PBS Buffer + 30 μ L 100X PIC(确保蛋白酶抑制剂混合物 PIC (100X)完全溶解)

配制细胞裂解液

试剂	体积
● Cell Swelling Buffer(10X)	100 μ L
100X PIC*	10 μ L
● DTT	1 μ L
ddH ₂ O	0.9 mL
总体积	约 1 mL

*,注: 甲醛溶液, 1X PBS, Glycine Solution (10X)需要客户自备; Glycine Solution (10X)提供并不足量; PIC, DTT 试剂使用时再加入。

实验步骤

3.1 称取新鲜或冻存的组织样品, 每个样品组需准备样品量: 100 到 150 mg 组织。

3.2 把样品置于 60 mm 或 100 mm 培养皿中, 用解剖刀切碎或剪刀剪碎成 1-2 mm 大小碎块。并保持样品一直处于冰上或低温, 避免蛋白降解。

3.3 转移切碎或剪碎的组织到 15 mL 的锥底离心管中。

3.4 每个样品组中加入 1 mL 预冷的 PBS+PIC。

3.5 每个样品组 (1 mL PBS+PIC) 加入 28 μ L 37%的甲醛溶液, 或 62.5 μ L 16% 的不含甲醇的甲醛溶液(可根据样品量调整, 保证甲醛终浓度为 1%即可), 使蛋白与 DNA 交联。室温下低速摇动不少于 10 min, 甲醛交联时间可以根据具体样本类型进行优化。

备注: 1、不要在高于 25°C 的环境内固定。

2、针对检测组织样本的部分转录因子或转录辅因子, 我们建议可进行如下交联优化:

1) 组蛋白或组蛋白修饰靶点, 推荐交联时间为 10 min 即可。

2) 对于转录因子或转录辅助因子, 推荐交联时间交联时间为 10-15 min。

3.6 向每个样品组 (1 mL PBS+PIC) , 加入 100 μ L 10X Glycine Solution 稍加转动使之混匀, 室温放置 5 min, 以终止交联反应。

3.7 4°C, 1,200 g 离心 5 min 收集固定后的组织样品。

3.8 去除上清后, 用 1 mL 预冷的 PBS+PIC 漂洗样品一次。

3.9 4°C, 1,200 g 再次离心 5 min。

3.10 重复 3.8 和 3.9 步骤各 1 次。

3.11 去除上清后, 重悬样品到 1 mL Cell Swelling Buffer (1X)+PIC 并置于冰上。

3.12 转移组织悬液到 Dounce 匀浆器或自动化匀浆设备, 把组织样品分解成单细胞悬液无组织块可见 (可以分出一小部分在光学显微镜下观察是否充分分解) 。

3.13 转移上清到离心管并立即进行后续的细胞核处理和染色质片段化处理 (参照步骤 2 细胞核抽提和染色质超声破碎) 。

中国

www.abclonal.com.cn

中国总部：湖北省武汉市江夏区东湖高新区高科园 3 路精准医疗产业基地项目一期 5 号楼

上海分子研发中心：上海市闵行区园美路 58 号紫竹新兴产业技术研究院 2 号楼 4 层

美国研发中心：86 Cummings Park Dr ,Woburn, MA 01801, United States

电话：400-999-6126

邮箱：cn.market@abclonal.com