

ChIP 标准操作流程

一、实验试剂

- (1) PBS 缓冲液 (RM00012)
- (2) TE 缓冲液
- (3) 甲醛:40%
- (4) 甘氨酸:20%
- (5) Lysis Buffer
- (6) Dilution buffer
- (7) Wash buffer I
- (8) Wash buffer II
- (9) Wash buffer III
- (10) Elution buffer
- (11) rProtein A/G Plus MagPoly Beads (RM09008)

二、实验步骤

1. 细胞裂解

- (1) 取 1×10^7 细胞, 加入 1ml PBS 和 25ul 甲醛 (40%) 混匀后, 于冰上放置 10min (混匀 2-3 次)。
- (2) 加入 50ul 甘氨酸 (20%), 混匀后静置 5min。
- (3) 3000rpm 离心 5min, 用 1ml PBS 清洗 2 遍。
- (4) 加入 200ul Lysis Buffer (含 10ul 蛋白酶抑制剂), 置于旋转摇床 4℃ 裂解 30min。
- (5) 加入 800ul Dilution buffer, 混匀后超声 15-20min。
- (6) 12000rpm 离心 10min 取上清, 吸取少量裂解液 DNA 回收检测。
- (7) 琼脂糖电泳检测 DNA 打断程度, DNA 长度应在 150-900 bp 之间。
- (8) 使用 Qubit™ 荧光定量仪检测染色质浓度。

注意: 整个过程在低温下进行, 超声条件根据检测结果进行调整。

2. IP(免疫沉淀: 磁珠法):

- (1) 取 60ul 磁珠加入 1ml BSA (1mg/ml, TE 缓冲液配制), 于旋转摇床 4℃ 旋转 5min, 至于磁力架弃去液体, 加入 1ml BSA 重复此操作 1 次。
- (2) 加入 1ml TE 溶液清洗磁珠两次, 于 4℃ 放置备用。
- (3) 取 180ul 染色质裂解液, 加入 320ul Dilution buffer (一份 IP 样品), 分别加入 5ul 抗体, 1ul

Normal Rabbit IgG, 5ul Histone H3 于 4℃过夜, 然后加入 60ul 处理好的磁珠, 4℃孵育 2h。

(4) 依次使用 Wash buffer I/II/III 洗涤磁珠, 完成后使用 TE 溶液洗涤两次。

(5) 弃去上清后加入 200ul Elution buffer, 置于旋转摇床室温旋转 10min。

(6) 吸取上清加入 10ul 蛋白酶 K, 65℃水浴至少 4h。

(7) 使用 DNA 回收试剂盒回收 DNA。

注意: 每份 IP 样本应含 DNA 的量为 7-10ug DNA(转录因子 15-20ug), 抗体加入量为 3-5ug, 可根据实验进行优化。

3. Q-PCR:

(1) 反应体系 (20ul)

DNA 模板: 5ul

引物: 5ul

Green Master Mix : 10ul

(2) 反应程序

Stage 1	预变性 a	Reps: 1	95 °C	5 min
Stage 2	循环反应 b	Reps: 40	95 °C	10 sec
			60 °C	30 sec
Stage 3	融解曲线 c	Reps: 1	95 °C	15 sec
			60 °C	60 sec
			95 °C	15 sec

4. 结果计算

假设 Input 起始浓度为 a, Ct1 个循环数扩增后达到阈值; IgG 起始浓度为 b, Ct2 个循环数扩增后达到阈值; 目的蛋白起始浓度为 c, Ct3 个循环数扩增后达到阈值。则可以得到如下公式:

$$a \times 2^{Ct1} = b \times 2^{Ct2} = c \times 2^{Ct3}$$

$$b/a = 2^{Ct1}/2^{Ct2} = 2^{(Ct1-Ct2)} \quad b: a = 2^{(Ct1-Ct2)}$$

$$c/a = 2^{Ct1}/2^{Ct3} = 2^{(Ct1-Ct3)} \quad c: a = 2^{(Ct1-Ct3)}$$

$$\text{检测结果} = 2^{(Ct1-Ct3)} / 2^{(Ct1-Ct2)}$$