Waals™ Chromatin IP (ChIP) Kit

操作说明

- **描　述：** Waals™ Chromatin IP (ChIP) Kit，包含 Protein A/G Magnetic Beads, Chromatin IP Buffer, 10 × Glycine Solution, 5 M NaCl, RNase A, Proteinase K, 0.1 M DTT, Low Salt Wash Buffer, High Salt Wash Buffer, LiCl Wash Buffer, Elution Buffer。【注】使用者需准备高纯度甲醛（推荐 16% Formaldehyde, Methanol-Free #12606, CST）、PBS 及 DNA 纯化相关试剂。
- **试剂盒储存：** Waals™ Chromatin IP Kit (Part I)，4℃储存（勿冷冻）；Waals™ Chromatin IP Kit (Part II)，-20℃储存。
- **自备试剂：** 甲醛溶液（推荐 CST）、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂（按需）、DNA 纯化试剂盒
- **介　绍**

细胞核中存在大量蛋白质与 DNA 的复合物，它们的相互作用发挥重要的生物学功能。Waals™ Chromatin IP Kit 提供的试剂可以稳定获得目的蛋白与 DNA 复合物；通过 DNA 纯化可用于后续研究。

操作步骤

- **样品准备**

1. 细胞数量：

建议使用 1 - 5 × 10^7 个细胞进行 ChIP 实验。细胞数量过少可能导致 DNA 浓度不足，影响后续实验。

2. 甲醛交联：

(1) 配制 1%甲醛溶液：将 20 mL 无血清培养基与甲醛溶液混匀，使甲醛的终浓度为 1%。

(2) 弃去细胞培养基，用 PBS 洗涤细胞 2 次，去除残留的培养基。

(3) 加入 1%甲醛溶液，室温孵育 2-10 分钟。注意：交联时间根据实验需求调整，通常 2-10 分钟足够。交联时间过长可能导致 DNA 片段过大，影响后续超声处理。

3. 终止交联：

(1) 加入 2 mL 10 × 甘氨酸溶液，摇匀，室温反应 5 分钟，终止交联反应。

(2) 弃去上清液，加入 10 mL 预冷的 PBS，洗涤细胞 2 次，去除残留的甲醛和甘氨酸。

4. 细胞收集：

(1) 加入 10 mL 预冷的 PBS，用细胞刮将细胞刮下，并转移至 15 mL 离心管中。

(2) 1000 × g，4℃，离心 5 分钟，弃去上清液。

5. 细胞裂解：

加入 1 mL Chromatin IP Buffer，**【注】**使用前加入适量的蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂，充分混匀，冰上反应 10 分钟。

■ **超声处理**

1. 使用超声仪将 DNA 打断成 200 - 1000 bp 的片段。**【注】**超声条件需要根据细胞类型和超声仪型号进行优化。
2. 推荐条件：使用 3mm 探头，设置最大超声功率约 300W，每次超声 20 秒，休息 40 秒，重复 10-20 次。注意：避免样品过热，超声过程中不要产生气泡。
3. 超声后，8000 × g，4℃，离心 10 分钟，收集上清液，即获得**交联染色质制备物**，可置于-80℃保存。
4. 取出 50 μL 已超声的样品检测 DNA 的浓度及片段大小。**【注】**可根据 DNA 的片段大小调整超声时间。

■ **检测 DNA 浓度及片段大小**

1. 取出 50 μL 超声后的样品，加入 4.8 μL 5 M NaCl 和 2 μL RNase A（10 mg/mL），65℃反应 2 小时。
2. 加入 2 μL Proteinase K（20 mg/mL），60℃反应 1 小时。
3. 使用 DNA 纯化试剂盒或酚氯仿法纯化 DNA。
4. 将 DNA 稀释 50 倍，检测 OD260 值，计算 DNA 浓度（μg/mL = OD260 × 2500）。理想 DNA 浓度应在 50-200 μg/mL。
5. 使用 1%琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 片段大小，确保 DNA 片段在 200-1000 bp 之间。

■ **Chromatin IP**

【注】Chromatin IP Buffer 在使用前已加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂。

1. **按照下表配制 Chromatin IP Mix**：

试剂名称	体积（μL）	终浓度
Chromatin IP Buffer	0 - 300	-
0.1 M DTT	5	1 μM
交联染色质制备物	200 - 500	-
用 Chromatin IP Buffer 补足至	500 μL	

【注】应设置阴性对照和阳性对照。同时取出 10 μL **交联染色质制备物**作为 Input。

2. 抗体孵育：

在 **Chromatin IP Mix** 中加入 IP 级抗体，混匀，4℃旋转孵育 4 小时以上或过夜。

【注】抗体使用量通常为 2-5 μg，具体用量参考抗体生产商的推荐。

3. 磁珠处理：

(1) 将 Protein A/G Magnetic Beads 重悬，取 50 μL 至新的离心管中。

(2) 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。

(3) 加入 100 μL Chromatin IP Buffer，重悬磁珠，置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。

(4) 重复洗涤一次。

4. 免疫沉淀：

将 **Chromatin IP Mix** 加入含有磁珠的离心管中，4℃旋转孵育 2 小时。

5. 洗涤步骤：

(1) 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。

(2) 加入 1 mL Low Salt Wash Buffer，温和重悬磁珠，4℃旋转孵育 5 分钟。

(3) 重复洗涤 2-3 次。

(4) 加入 1 mL High Salt Wash Buffer，温和重悬磁珠，4℃旋转孵育 5 分钟。

(5) 加入 1 mL LiCl Wash Buffer，温和重悬磁珠，置于磁力架上，收集磁珠。

6. 洗脱：

(1) 加入 100 μL Elution Buffer，涡旋，65℃孵育 30 分钟。

(2) 将离心管置于磁力架上，收集上清液至新的离心管中。

7. DNA 纯化：

(1) 向每个反应（包括 Input）中加入 6 μL 5 M NaCl 和 2 μL Proteinase K，65℃反应 2 小时。

(2) 使用 DNA 纯化试剂盒或酚氯仿法纯化 DNA。【推荐】Waals™ DNA Purification Kit, DPF01-100T。

■ 注意事项

问题	可能的原因	建议
1. DNA 的片段过大	细胞可能过度交联，或超声时间不足	在使用甲醛溶液固定时可适当缩短时间；可适当增加超声时间。
2. DNA 的片段过小	超声时间过长，或存在 DNA 酶污染	可缩短超声时间；避免污染
3. 浓度过低	活性细胞数量不足，或细胞核为完全裂解	在行 Chromatin IP 之前应先检测 DNA 浓度，以评估样品制备情况。
4. Chromatin IP 反应后 PCR 检测无产物	抗体不合适 IP 实验，或蛋白与目的 DNA 不结合	选择合适的 IP 级抗体；设置阳性对照和阴性对照。