Waals™ Flag-Tag Protein-DNA Enrichment Kit

操作说明

- **描　述：**Waals™ Flag-Tag Protein-DNA Enrichment Kit, 包含 Anti-Flag Magnetic Beads, Chromatin IP Buffer, 10 × Glycine Solution, 5 M NaCl, RNase A, Proteinase K, 100 × Protease Inhibitor Cocktail, 0.1 M DTT, Low Salt Wash Buffer, High Salt Wash Buffer, LiCl Wash Buffer, Elution Buffer。使用者需准备 36 - 40%甲醛、PBS 及 DNA 纯化相关试剂（或采用 Waals™ DNA Purification Kit）。
- **试剂盒储存：**Waals™ Flag-Tag Protein-DNA Enrichment Kit (Part I)，4℃储存（勿冷冻）；Waals™ Flag-Tag Protein-DNA Enrichment Kit (Part II)，-20℃储存。
- **介　绍**

细胞核中存在大量蛋白与 DNA 的复合物，它们的相互作用发挥重要的生物学功能。Waals™ Flag-Tag Protein-DNA Enrichment Kit 提供的试剂可以稳定获得 Flag 融合蛋白与 DNA 的复合物；通过 DNA 纯化可用于后续研究。

操作步骤

- **细胞准备**

1. 需要 1 - 5 × 10^7 个细胞用于 Chromatin IP 实验。将培养皿中的培养基弃掉。
2. 将 20 mL 无血清培养基与 550 µL 甲醛溶液（36 - 40%）混匀，加入培养皿中，室温孵育（2-10 分钟；【注】蛋白与 DNA 交联时间根据实际情况而定）。
3. 加入 2 mL 10 × 甘氨酸溶液，摇匀，室温反应 5 分钟。
4. 弃掉上清液，加入 10 mL 预冷的 PBS，润洗细胞 2 次。
5. 加入 10 mL 预冷的 PBS，将细胞刮下并转移至新的 15 mL 离心管中。
6. 1000 × g，4℃，离心 5 分钟。
7. 弃掉上清液，加入 Chromatin IP Lysis Buffer（1 mL per 1 × 10^7 个细胞），混匀，冰上反应 10 分钟。

■ **超声法处理细胞**

1. 超声处理细胞沉淀，将 DNA 打断成大小为 200 - 1000 bp 的片段。该步骤需要优化，因为不同的细胞系可能需要不同的超声时间。【注】可使用 3mm 的探头，设置最大超声功率的 30 - 40%，每次超声时间 20 秒，共计 3 次（时间和次数可根据实际情况调整，但应避免样品过热）。另外，可用光学显微镜观察细胞核的破碎情况。
2. 8000 × g，4℃，离心 10 分钟。将上清液转移至新的离心管中，即获得交联染色质制备物，可置于-80℃保存。
3. 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. 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. 纯化 DNA（可用 DNA 纯化试剂盒或酚氯仿，或采用 Waals™ DNA Purification Kit）。
4. 将 DNA 稀释 50 倍，检测已稀释 DNA 的 OD260（此时 DNA 的浓度可按照 μg/mL = OD260 × 2500 进行计算），DNA 的浓度理想值在 50 - 200 μg/mL。用 1%的琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 的片段大小。

■ **Chromatin IP**

【注】Chromatin IP Buffer 在使用时确认已完全溶解。

1. 用 Waals™ Chromatin IP Kit 提供的试剂按照下表配制 Chromatin IP Mix：

试剂名称	体积（μL）	终浓度
Chromatin IP Buffer	300	-
0.1 M DTT	5	1 μM
100 × Protease Inhibitor Cocktail	5	1 ×
交联染色质制备物	100 - 150	-
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. 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】抗体的使用量可根据抗体生产商的推荐量或使用者的经验而定。一般情况下每次反应需要的抗体在 2 - 5 μg 之间。
3. 将 Anti-Flag 磁珠重悬，加入 50 μL 磁珠至每个 Chromatin IP 反应中，4℃旋转孵育 2 小时。
4. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
5. 加入 1 mL Low Salt Wash Buffer 温和重悬磁珠，在 4℃旋转孵育 5 分钟。
6. 重复步骤 5 和 6 两次。
7. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
8. 加入 1 mL High Salt Wash Buffer 洗液，在 4℃旋转孵育 5 分钟。
9. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠并弃掉上清液。
10. 加入 1 mL LiCl Wash Buffer，温和重悬磁珠。
11. 将离心管置于磁力架上，收集磁珠。【注】上清液可用于分析未结合的样品是否被洗净。
12. 加入 100 μL Elution Buffer 至每个反应中，涡旋，在 65℃孵育 30 分钟。
13. 将离心管置于磁力架上，收集上清液至新的离心管中。
14. 向每个反应中（包括 Input）加入 6 μL 5M NaCl 和 2 μL Proteinase K，在 65℃反应 2 小时或过夜。该样品可置于-20℃保存数天。
15. 纯化 DNA。【注】可用 DNA 纯化试剂盒或酚氯仿（或采用 Waals™ DNA Purification Kit）。

■ 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。