

EasyChIP Protein A/G MagBeads (ChIP 级蛋白 A/G 磁珠)

货号: RM02915

规格: 1mL/ 5×1 mL

◆ 产品简介

染色质免疫共沉淀技术是一种检测蛋白质与 DNA 结合的实验技术。其原理是在活细胞状态下固定蛋白质 - DNA 复合物, 并将其随机切断为一定长度范围内的染色质小片段, 然后通过免疫学方法沉淀此复合体, 特异性地富集目的蛋白结合的 DNA 片段, 通过对目的片断的纯化与检测, 从而检测转录因子等目的蛋白质与 DNA 的结合情况, 鉴定基因启动子或其它 DNA 结合位点。该方法同时也可应用于研究基因组特定定位点的组蛋白修饰情况。

◆ 自配试剂

PBS, 37%-40%甲醛, 蛋白酶 K, 蛋白酶抑制剂 Cocktail, DNA 纯化试剂盒, ChIP 抗体, ChIP 引物, ChIP 裂解液, ChIP 缓冲液, 洗涤液 1, 洗涤液 2, 洗涤液 3, TE 缓冲液, 5M NaCl, 2M 甘氨酸, ChIP 洗脱液 (1% SDS, 0.1M NaHCO₃), 细胞超声破碎仪。

◆ 磁珠信息

磁珠浓度: 10mg/mL

磁珠粒径: 1μm

磁珠效价: >60μg 兔 IgG/mg 磁珠; >40ug 鼠 IgG/mg 磁珠

◆ 保存条件

2-8℃保存, 保质期 12 个月。

◆ 操作流程

一、收集细胞和交联

1. 收集 2.5×10^7 或更多细胞, 均匀重悬于 10mL 新鲜培养基中。
2. 每 10mL 培养基中加入 270 μL 37%-40%甲醛溶液 (甲醛终浓度为 1%), 室温缓慢旋转或震荡 10min, 将细胞交联。添加甲醛可能导致培养基颜色发生变化。

二、终止交联

1.加入 650μL 2M 甘氨酸溶液终止交联，中和剩余的甲醛（甘氨酸终浓 130mM）。室温缓慢旋转或震荡 5min。
添加甘氨酸可能导致培养基颜色发生变化。

2.4℃ 1500 rpm，离心 5min，弃上清。

3.用 10mL 预冷的 PBS 重悬洗涤。4℃ 1500 rpm，离心 5min，弃上清。

4.重复步骤 3。

三、染色质碎裂

1.ChIP 裂解液按比例加入蛋白酶抑制剂 Cocktail，每 2.5×10^7 细胞用 1mL ChIP 裂解液重悬并吹打至均匀混合，冰浴 10min，以充分裂解细胞。将 1mL 细胞悬浮液转移到大小合适的离心管中进行超声处理。

2.超声处理染色质，超声处理条件可能需要通过测试不同超声波仪功率和超声处理时长来确定。直至找到比较合适的超声条件可以使大部分基因组 DNA 断裂成 200-1000bp 大小。采用 3mm 探头，功率 25%，超声 4.5S，间歇 9S，循环 14 次。通常能产生良好的碎裂性能。

3.请确保在超声处理时以及各处理步骤之间将含有染色质的离心管置于冰浴中，以便让染色质样品在超声处理期间保持冷却。切勿让探头接触到离心管底部或离心管壁。如果染色质样品在超声处理期间起泡，则停止超声处理并调整离心管位置。

4.完成超声后，4℃ $13,400 \times g$ 离心超声产物 5~10min，弃沉淀留上清另管，保存于-80℃。

5.取 10μL 样本另存，后续用琼脂糖凝胶电泳鉴定超声效果，进行质控。

四、分析染色质碎裂程度

1.用于质控的样品用 TE 缓冲液补充体积到 250μL，加入 10μL 5M NaCl 溶液，65℃金属浴/水浴 1h 以上以解交联。

2.再加入蛋白酶 K 1μL，55℃金属浴/水浴至少 1h。

3.用 DNA 纯化试剂盒或酚仿抽提法纯化样本中的 DNA。

4.DNA 纯化后，通过在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳来确定 DNA 片段大小。超声后 DNA 片段应集中于 200-1000bp，如有较多片段小于 200bp 或大于 1000bp 则样本不适用于后续实验。

五、去背景及 IP

1.确定免疫沉淀的次数时，计入阳性对照（抗体组）和阴性对照（IgG 组）。

2.配置足量 ChIP 缓冲液，预冷并加入蛋白酶抑制剂 Cocktail。

- 3.取 110 μ L ChIP 级 PA/G 磁珠(按 1 个反应,实验预处理使用 20 μ L ChIP 级 PA/G 磁珠且 IP 时使用 35 μ L ChIP 级 PA/G 磁珠)。使用 ChIP 缓冲液预洗 3 次后,置于 4 $^{\circ}$ C或冰上备用。
- 4.用步骤“三.4”所得产物(1mL 对应细胞 2.5×10^7 ;若从-80 $^{\circ}$ C取出则放置于冰上 15min 后转移至 4 $^{\circ}$ C 15min 缓慢解冻)按 4×10^6 细胞/每反应,用已备好的 ChIP 缓冲液补齐到 1mL。
- 5.取出 10 μ L 稀释的染色质样品并将其转移至离心管。这将作为 1%输入对照,该样品在后续使用之前可以置于 -20 $^{\circ}$ C下贮存。
- 6.进行实验预处理,加入与实验所用抗体种属同源的 IgG 1~2 μ g/mL,轻柔颠倒混匀后加入 20 μ L ChIP 级 PA/G 磁珠,4 $^{\circ}$ C缓慢旋转或震荡 2h,此步骤用于去除背景和噪音。
- 7.将样品放在磁分离架上静置 5min,丢弃沉淀取上清转移到新的离心管。
- 8.对于阳性对照,按说明书所推荐浓度,向免疫沉淀样品加入抗体。对于阴性对照,加入免疫沉淀样品所用抗体种属同源的 IgG 1~2 μ g/mL。
- 9.所有样本 4 $^{\circ}$ C缓慢旋转或震荡过夜。
- 10.加入 35 μ L ChIP 级 PA/G 磁珠,4 $^{\circ}$ C缓慢旋转孵育 2h。

六、洗涤,洗脱及解交联

- 1.将洗涤液 1,洗涤液 2,洗涤液 3,TE 缓冲液预冷并加入蛋白酶抑制剂 Cocktail 备用。
- 2.加入 1mL 洗涤液 1,4 $^{\circ}$ C缓慢旋转 5min。离心管放在磁分离架上静置 5min,小心地移除上清液。
- 3.加入 1mL 洗涤液 2,4 $^{\circ}$ C缓慢旋转 5min。离心管放在磁分离架上静置 5min,小心地移除上清液。
- 4.加入 1mL 洗涤液 3,4 $^{\circ}$ C缓慢旋转 5min。离心管放在磁分离架上静置 5min,小心地移除上清液。
- 5.加入 1mL TE 缓冲液,4 $^{\circ}$ C缓慢旋转 5min。离心管放在磁分离架上静置 5min,小心地移除上清液。
- 6.加入 150 μ L 新鲜配制的 ChIP 洗脱液(不需要加蛋白酶抑制剂 Cocktail,碳酸氢钠需要数分钟溶解,建议提前配置)。在 65 $^{\circ}$ C下,通过轻轻涡旋(1200 rpm)将染色质从 ChIP 级 PA/G 磁珠上洗脱下来,持续 30min。这个步骤最好使用恒温混匀仪,但在 65 $^{\circ}$ C金属浴/水浴中频繁混合也可。
- 7.样品短暂离心 10S,以便回收离心管盖上的蒸发样品。
- 8.将样品放在磁分离架上静置 5min。将洗脱下来的染色质上清液转移至新离心管。
- 9.向 1% 输入对照样品中用 ChIP 洗脱液补齐至 150 μ L。
- 10.向所有样品(包括 1%输入对照)加入 6 μ L 5M NaCl 和 2 μ L 蛋白酶 K,并在 65 $^{\circ}$ C下孵育 2 小时以上。这次孵育建议延长过夜。

七、纯化 DNA

1. 所得洗脱产物可用 DNA 纯化试剂盒或酚仿抽提法纯化提取其中的 CHIP-DNA，可用于下一步的 qPCR 验证或测序等后续实验。

◆ 保存条件

1. 磁珠液 pH 值为 7-8，禁止冻结。
2. 磁珠应避免高速离心、干燥或冻存（可以瞬时离心），禁止长时间置于磁场，可能会引起磁珠聚团，抗体结合后操作过程应轻柔，避免抗体脱落。
3. 超声处理会使磁珠在样品中捕获的抗体脱落，所以磁珠在捕获抗体后不宜使用该方法重悬磁珠。
4. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。

◆ 常见问题及对策

Q1：如何提高抗体与磁珠结合效率？

A1：磁珠与抗体的结合效率与抗体的种属来源及所属亚型有关，请确认抗体的类型与 ProteinA/G 配基的亲效率和。如抗体所属亚型与 ProteinA/G 的亲密度较低，可以通过增加抗体与磁珠的孵育时间（30 ~ 120min）、提高结合缓冲液的 pH 值（8 ~ 9）及降低离子强度（25 ~ 100mMNaCl）等方法提高亲和效率。

Q2：如何提高磁珠在免疫沉淀反应中的特异性？

A2：可以先将抗体与样品进行孵育，形成抗体-抗原复合物，再用 ProteinA/G 磁珠捕获复合物。这种方法可以提高抗体与抗原的结合效率，并降低磁珠与样品接触的时间，从而提高沉淀产物的特异性。对于蛋白质/核酸共沉淀或染色质免疫共沉淀也推荐使用此法。

Q3：如何避免磁珠在储存或使用过程中可能出现的聚集情况？

A3：磁珠应保存在 2 ~ 8℃，使用时应避免由于污染而导致的不可逆聚集，或因干燥而导致的聚集。磁珠在低 pH 的洗脱缓冲液中发生聚集属于正常现象，不影响磁珠的正常使用。

Q4：如何解决磁珠易粘附管壁的现象？

A4：建议使用低吸附率的耗材进行磁珠操作。另外，在缓冲液中添加 0.01% ~ 0.1%(v/v)的非离子型去垢剂（如 NP-40、Tween-20 或 TritonX-100）可以有效降低磁珠对耗材的粘附。

Q5：磁珠在使用过程中出现结块现象？

A5：磁珠在使用时如果出现结块现象一般较难振荡打散，容易导致分布不均，出现该问题的原因是磁珠在磁场中放置太久而使磁珠牢固的结合在一起。用超声波水浴处理 2min 即可打散磁珠使其重新分散，但应注意超声处理也会使磁珠在样品溶液中捕获的抗体脱落，所以磁珠在加样后洗脱前不宜使用该方法。