

细胞染色质免疫共沉淀 (ChIP) 试剂盒

20T WLA106a



仅用于科学研究,不能用于诊断

产品信息

产品名称 细胞染色质免疫共沉淀 (ChIP) 试剂盒

产品概述 染色质免疫沉淀技术 (chromatin immunoprecipitation assay, ChIP) 作为最佳的研究体内DNA与蛋白质相互作用的方法,它的基本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,从而获得蛋白质与DNA相互作用的信息。

包装信息

试剂盒组分	WLA106a (20T)	保存条件
1M 甘氨酸	26ml	4°C
蛋白酶抑制剂	300μl	-20°C
Buffer A	20ml	4°C
Buffer B	10ml	4°C
Chip Dilution Buffer	24ml	4°C
ProteinA+G beads	2.4ml	4°C
RNA Polymerase II(0.5ug/ul)抗体	40μl	-20°C
正常血清 IgG	40μl	-20°C
Low Salt Wash Buffer	20ml	4°C
High Salt Wash Buffer	20ml	4°C
LiCl Wash Buffer	20ml	4°C
TE Buffer	40ml	4°C
RNaseA	20μl	-20°C
Proteinase K	20μl	-20°C
阳性对照引物	20μl	-20°C

注意事项

1. 甲醛固定时,时间不宜过长,10min即可。
2. 超声时温度不能过高,最好冰浴进行;防止样品起沫。
3. 样品中加入填料后离心转数不能过大,防止填料破碎。
4. 蛋白酶抑制剂使用前室温融化。
5. 提供的阳性对照引物,可用于扩增human GAPDH的部分相应序列,引物序列为:
5'-TACTAGCGGTTTTACGGGCG-3'; 5'-TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA-3'。

操作流程

1. 每皿细胞 (9ml 培养液), 加入243μl 37%甲醛,使得甲醛的终浓度为1%,室温培养10min。
2. 终止交联: 加1M 甘氨酸1.26ml,使其终浓度为0.125M,室温培养5min。
3. 吸尽培养基,用预冷的PBS洗两次后,加适量蛋白酶抑制剂 (2ml PBS中加入5μl 蛋白酶抑制剂),用细胞刮收集细胞,2000rpm, 4°C离心5min。
4. 弃上清,加入1ml Buffer A,冰上放置10min, 3000-5000rpm离心5min。
5. 弃上清,加入400μl Buffer B重悬后加入5μl 蛋白酶抑制剂。
6. 超声破碎。一般来说,300W超声10s,间隔30s,12次。12000rpm, 4°C离心20min。取20μl上清进行步骤17-21之后进行电泳检测,抹带集中在500-1000bp左右即可。
7. 样品分成三组,每组100μl, A: 实验组; B: 阳性对照组; C: 阴性对照组,剩余样品可放置-80°C保存。
8. 在三组样品中分别加入900μl Chip Dilution Buffer。

细胞染色质免疫共沉淀 (ChIP) 试剂盒

20T WLA106a



仅用于科学研究,不能用于诊断

产品信息

9. 准备ProteinA+G beads, 用1ml PBS 清洗三次 (3000rpm离心1min) 后保存备用, 此步可提前准备。
10. 三组样品中各加入60μl ProteinA+G beads, 4°C颠倒混匀1-2h。
11. 混匀后4°C静置10min, 3000rpm离心1min。
12. 取上清, 每组样品取20μl进行Input实验, -20°C保存。
13. 实验组中加入1-10μg抗体; 阳性对照组加入1μg RNA Polymerase II抗体; 阴性对照组加入1μg正常血清IgG, 4°C颠倒混匀过夜。
14. 三组样品中再加入60μl ProteinA+G beads, 4°C颠倒混匀1-2h。
15. 洗涤ProteinA+G beads。依次用下列溶液清洗沉淀复合物。清洗步骤为: 加入1ml 预冷溶液, 在4°C混匀10min, 3000rpm离心1min, 除去上清。
 - a. Low Salt Wash Buffer, 1次。
 - b. High Salt Wash Buffer, 1次。
 - c. LiCl Wash Buffer, 1次。
 - d. TE Buffer, 2次。
16. 每管加入100μl Elution Buffer (100μl 10%SDS+100μl 1M NaHCO₃+800μl ddH₂O), 室温颠转10min后3000rpm离心1min, 收集上清。重复洗脱1次, 终体积200μl。
17. 取出Input实验样品, 室温融化后加入180μl Elution Buffer。
18. 解交联。每管中加入8μl 5M NaCl, 混匀, 65°C解交联过夜。
19. 解交联结束后, 每管加入1μl RNaseA, 37°C孵育1h。
20. 每管加入4μl 0.5M EDTA, 8μl 1M Tris-HCl (PH=6.5), 1μl Proteinase K, 45°C孵育2h。
21. DNA片段回收 (WLA092a PCR纯化试剂盒)。
22. 对照品的PCR。