

20T WLA106a



产品名称 细胞染色质免疫共沉淀 (ChIP) 试剂盒

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, 通过对目的片段的纯化与检测, 从而获得蛋白质与DNA相互作用的信息。

试剂盒组分	WLA106a (20T)	保存条件	有效期
1M 甘氨酸	26ml	4℃	一年
蛋白酶抑制剂	300μl	-20℃	一年
Buffer A	20ml	4℃	一年
Buffer B	10ml	4℃	一年
Chip Diluiton Buffer	24ml	4℃	一年
ProteinA+G beads	2.4ml	4℃	一年
RNA Polymerase II(0.5ug/ul)抗体	40μl	-20℃	一年
正常血清 IgG	40μl	-20℃	一年
Low Salt Wash Buffer	20ml	4℃	一年
High Salt Wash Buffer	20ml	4℃	一年
LiCl Wash Buffer	20ml	4℃	一年
TE Buffer	40ml	4℃	一年
RNaseA	20μl	-20℃	一年
Proteinase K	20μl	-20℃	一年
阳性对照引物	20μl	-20℃	一年

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'。
6. 开封后请尽快使用。

1. 每血细胞（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℃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℃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。

细胞染色质免疫共沉淀 (ChIP) 试剂盒

20T WLA106a

Wanleibio



仅用于科学研究,不能用于诊断

产品信息

7. 样品分成三组, 每组100 μ l, A: 实验组; B: 阳性对照组; C: 阴性对照组, 剩余样品可放置-80 $^{\circ}$ C保存。
8. 在三组样品中分别加入900 μ l Chip Dilution Buffer。
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60 μ l ProteinA+G beads, 4 $^{\circ}$ C颠倒混匀1-2h。
11. 混匀后4 $^{\circ}$ C静置10min, 3000rpm离心1min。
12. 取上清, 每组样品取20 μ l进行Input实验, -20 $^{\circ}$ C保存。
13. 实验组中加入1-10 μ g抗体; 阳性对照组加入1 μ g RNA Polymerase II抗体; 阴性对照组加入1 μ g正常血清IgG, 4 $^{\circ}$ C颠倒混匀过夜。
14. 三组样品中再加入60 μ l ProteinA+G beads, 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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100 μ l Elution Buffer (100 μ l 10%SDS+100 μ l 1M NaHCO₃+800 μ l ddH₂O), 室温颠转10min后3000rpm离心1min, 收集上清。重复洗脱1次, 终体积200 μ l。
17. 取出Input实验样品, 室温融化后加入180 μ l Elution Buffer。
18. 解交联。每管中加入8 μ l 5M NaCl, 混匀, 65 $^{\circ}$ C解交联过夜。
19. 解交联结束后, 每管加入1 μ l RNaseA, 37 $^{\circ}$ C孵育1h。
20. 每管加入4 μ l 0.5M EDTA, 8 μ l 1M Tris-HCl (PH=6.5), 1 μ l Proteinase K, 45 $^{\circ}$ C孵育2h。
21. DNA片段回收 (WLA092a PCR纯化试剂盒)。
22. 对照品的PCR。
23. 取出每种PCR反应物10 μ l, 采用琼脂糖凝胶电泳, 最后根据电泳结果进行分析。