

组织染色质免疫共沉淀 (ChIP) 试剂盒

20T WLA122



仅用于科学研究,不能用于诊断

产品信息

产品名称 组织染色质免疫共沉淀 (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,通过对目的片段的纯化与检测,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	WLA122 (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-

操作流程

1. 称取新鲜的组织或冰冻的组织,用振动切片器将组织切成1-3mm小块。
2. 转移组织至50ml离心管中,用预冷的PBS清洗3次,去除PBS,加培养液(1640)至9ml。
3. 加入243 µl 37%甲醛,使得甲醛终浓度为1%,室温摇床15min。
4. 终止交联:加1M 甘氨酸1.26ml,使其终浓度为0.125M,室温摇床5min。
5. 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),用玻璃匀浆器将组织磨碎,形成单细胞悬液,2000rpm,4°C离心5min。
6. 弃上清,加入1ml Buffer A,冰上放置10min,3000-5000rpm离心5min。
7. 弃上清,加入400µl Buffer B(每100µl Buffer B中含有10⁶细胞)重悬后加入5µl 蛋白酶抑制剂。
8. 超声破碎。一般来说,300W超声15s,间隔45s,13次。12000rpm,4°C离心20min。取20µl上清进行步骤19-23之

组织染色质免疫共沉淀 (ChIP) 试剂盒

20T WLA122



仅用于科学研究,不能用于诊断

产品信息

9. 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。
10. 在三组样品中分别加入900 μ l Chip Dilution Buffer。
11. 准备Protein A beads, 用1ml PBS 清洗三次 (3000rpm离心1min) 后保存备用, 此步可提前准备。
12. 三组样品中各加入60 μ l Protein A beads, 4 $^{\circ}$ C颠倒混匀1-2h。
13. 混匀后4 $^{\circ}$ C静置10min, 3000rpm离心1min。
14. 取上清, 每组样品取20 μ l进行Input实验, -20 $^{\circ}$ C保存。
15. 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过夜孵育。
16. 三组样品中再加入60 μ l Protein A beads, 4 $^{\circ}$ C颠倒混匀1-2h。
17. 洗涤Protein A 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。
18. 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。
19. 取出Input实验样品, 室温融化后加入180 μ l Elution Buffer。
20. 解交联。每管中加入8 μ l 5M NaCl, 混匀, 65 $^{\circ}$ C解交联过夜。
21. 解交联结束后, 每管加入1 μ l RNaseA, 37 $^{\circ}$ C孵育1h。
22. 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。
23. DNA片段回收 (WLA092a PCR纯化试剂盒)。
24. 对照品的PCR。

产品图片

