

## Chromatin Immunoprecipitation(ChIP) Kit

KT101-01 系列：不带阳性对照体系

Cat. No. KT101-0101 (12 rxns)

Cat. No. KT101-0102 (24 rxns)

Cat. No. KT101-0103 (48 rxns)

KT101-02 系列：包含阳性对照体系

Cat. No. KT101-0201 (12 rxns)

Cat. No. KT101-0202 (24 rxns)

Cat. No. KT101-0203 (48 rxns)

按试剂标签提示分开储存

For research use only, not intended for diagnostic testing.

## 产品简介:

ChIP 技术 (Chromatin Immunoprecipitation Assay, 染色质免疫沉淀), 是研究细胞核内 DNA 与蛋白结合情况的技术, 运用针对目标蛋白的抗体把相应的 DNA 蛋白复合物沉淀下来, 经过分离纯化就可以对结合在复合物上的 DNA 进行分析。本产品适用于大部分的动物细胞和组织。

本产品使用酶切法实现染色体断裂, 避免了使用超声仪进行断裂的条件限制。

## 试剂盒包装组分:

表 1 KT101-01 试剂盒包装组分信息

室温保存试剂				
编号	试剂	数量(12 rxns)	数量(24 rxns)	数量(48 rxns)
SCD-1	Cell lysis buffer	25mL	50mL	100mL
SCD-2	ChIP buffer	30mL	60mL	120mL
SCD-3	Elution buffer	5mL	10mL	20mL
SCD-4	5M NaCl	100uL	200uL	400uL
SCD-5	MNase digestion buffer	3mL	6mL	12mL
SCD-6	Low salt buffer	15mL	30mL	60mL
SCD-7	High salt buffer	15mL	30mL	60mL
SCD-8	LiCl buffer	15mL	30mL	60mL
SCD-9	TE buffer	15mL	30mL	60mL
4℃保存试剂				
SCD-10	ProteinaseK	150uL	300uL	600uL
SCD-11	proteinA/G 磁珠	400uL	800uL	1600uL
-20℃保存试剂				
SCD-12	蛋白酶抑制剂	150uL	300uL	600uL
SCD-13	PMSF	150uL	300uL	600uL
SCD-14	MNase	15uL	30uL	60uL
SCD-15	阴性抗体 IgG	35uL	70uL	140uL

表 2 KT01-02 阳性试剂盒包装组分信息

室温保存试剂				
编号	试剂	数量(12 rxns)	数量(24 rxns)	数量(48 rxns)
SCD-1	Cell lysis buffer	25mL	50mL	100mL
SCD-2	ChIP buffer	30mL	60mL	120mL
SCD-3	Elution buffer	5mL	10mL	20mL
SCD-4	5M NaCl	100uL	200uL	400uL
SCD-5	MNase digestion buffer	3mL	6mL	12mL
SCD-6	Low salt buffer	15mL	30mL	60mL

SCD-7	High salt buffer	15mL	30mL	60mL
SCD-8	LiCl buffer	15mL	30mL	60mL
SCD-9	TE buffer	15mL	30mL	60mL
<b>4℃保存试剂</b>				
SCD-10	ProteinaseK	150uL	300uL	600uL
SCD-11	proteinA/G 磁珠	400uL	800uL	1600uL
<b>-20℃保存试剂</b>				
SCD-12	蛋白酶抑制剂	150uL	300uL	600uL
SCD-13	PMSF	150uL	300uL	600uL
SCD-14	MNase	15uL	30uL	60uL
<b>阳性对照体系：（-20℃保存）</b>				
SCD-15	阴性抗体 IgG	35uL	70uL	140uL
SCD-16	阳性对照组抗体 H3K27ac	35uL	70uL	140uL
SCD-17	阳性检测引物 (human)	25uL (10uM)	50uL (10uM)	100uL (10uM)
SCD-18	阳性检测引物 (mouse)	25uL (10uM)	50uL (10uM)	100uL (10uM)
SCD-19	阳性检测引物 (rat)	25uL (10uM)	50uL (10uM)	100uL (10uM)

**注：**对照组与实验组消耗试剂量相同，一次 ChIP 实验含 Input 组、目的抗体组、阴性抗体组，要消耗 2 rxns 试剂量。

阳性对照体系为已知有明显结合的 H3K27ac 蛋白和 GAPDH 基因启动子区，本试剂盒阳性对照体系适用于人、小鼠、大鼠。引物序列如下：

GAPDH-human-F: CAGGAGGAGCAGAGAGCG      GAPDH-human-R: GGACTGGCTGAGCCTGG  
 GAPDH-mouse-F: GGTTCATCAGGTAAACTCAGG      GAPDH-mouse-R: GTGGCCAGGAAGACGCTTG  
 GAPDH-rat-F: CTGGTGCTCTCTGCTCCTC      GAPDH-rat-R: CCTAATTTCCATTCGTCTCC

### 实验过程摘要：

如图 1 所示，细胞或组织用甲醛固定后进行裂解，染色质经超声或酶解处理被碎裂成 100-1000 bp 的染色质片段。使用经 ChIP 验证的抗体和 ChIP-Grade Protein A/G 磁珠进行染色质免疫沉淀。随后将蛋白质-DNA 解交联，苯酚/氯仿提取和乙醇沉淀 DNA。免疫沉淀期间，特定 DNA 序列的富集可使用标准 PCR、定量实时 PCR、芯片 ChIP 扩增、测序或克隆技术等各种方法进行分析。

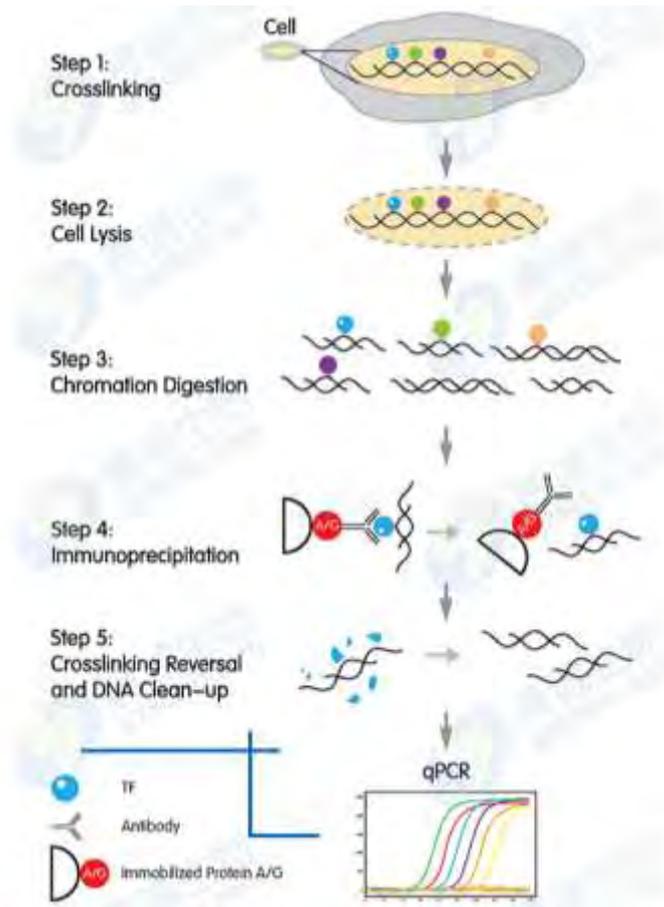


图 1 ChIP 试剂盒实验过程示意图

## 实验前准备

### 细胞准备

#### A 动物组织处理：细胞交联

细胞量：约  $1-2 \times 10^7$  个

动物组织经过组织匀浆或液氮研磨后，去除大颗粒组织后用 PBS 重悬细胞，然后进行甲醛交联，交联步骤参考如下：

1. 交联试剂配制：用 1xPBS 将 37% 甲醛稀释到 1% 浓度的溶液，混匀，一般现配现用；
2. PBS 重悬的细胞经 3000rpm 离心后去除上清液，加入交联试剂重悬细胞，需旋转交联，防止细胞聚团，交联试剂参考用量为  $1 \times 10^6$  细胞使用 1mL；

注：组织交联时间一般为 30min，可根据细胞类型调节，交联时间过长，染色质不容易打断，交联时间过短，染色质容易打碎。

3. 加入 1/10 体积的 10x 甘氨酸终止液（10x 甘氨酸终止液为 1.25M 甘氨酸）到交联体系中摇匀，旋转孵育 5min，终止交联反应；

4. 3000rpm 离心后去除上清液，加入 1ml 预冷 PBS 重悬细胞，然后离心去上清。
5. 重复上述清洗步骤 2 次，一共洗 3 次。最后去除上清液，留下细胞沉淀备用。

注：细胞沉淀要尽量将上清液彻底吸干再保存。

### B 动悬浮细胞交联：

细胞量：约  $3-4 \times 10^6$  个

悬浮细胞培养后之后收集到 1.5mL EP 管中进行甲醛交联，交联步骤参考如下：

1. 交联试剂配制：用 1xPBS 将 37%甲醛稀释到 1%浓度的溶液，混匀，一般现配现用；
2. 悬浮细胞经 3000rpm 离心后去除上清液，加入交联试剂重悬细胞，需旋转交联，防止细胞聚团，交联试剂参考用量为  $1 \times 10^6$  细胞使用 1mL；

注：细胞交联时间一般为 10min，可根据细胞类型调节，交联时间过长，染色质不容易打断，交联时间过短，染色质容易打碎

3. 加入 1/10 体积的 10x 甘氨酸终止液（10x 甘氨酸终止液为 1.25M 甘氨酸）到交联体系中摇匀，旋转孵育 5min，终止交联反应；
4. 3000rpm 离心后去除上清液，加入 1mL 预冷 PBS 重悬细胞，然后离心去上清。
5. 重复上述清洗步骤 2 次，一共洗 3 次。最后去除上清液，留下细胞沉淀-80℃保存备用或直接进行 ChIP 实验。

注：细胞沉淀尽量将上清液彻底吸干再保存。

### C 贴壁细胞交联：

细胞量：约  $3-4 \times 10^6$  个

贴壁细胞培养好之后有两种方法进行交联，一种是用细胞刮刮下收集到 EP 管中按悬浮细胞进行交联，另一种是直接培养皿中交联后再收集到 EP 管：

1. 交联试剂配制：用 1xPBS 将 37%甲醛稀释到 1%浓度的溶液，混匀，一般现配现用；

注：一个 10cm 的培养皿大约需要 3-5mL 交联试剂

2. 培养皿吸除培养基，然后加入适量的交联试剂，以覆盖住全部细胞略有多余为宜，室温静止交联 10min；

注：细胞交联时间一般为 10min，可根据细胞类型调节，交联时间过长，染色质不容易打断，交联时间过短，染色质容易打碎

3. 交联完成后，每 1mL 交联样本加入 100uL 10x 甘氨酸终止液（10x 甘氨酸终止液为 1.25M 甘氨酸）混匀，室温静止终止交联 5min，去掉液体；
4. 然后细胞用胰酶消化或用细胞刮刮下来，收集到 1.5mL EP 管，3000rpm 离心后去除上清

液；

5.加入 1-2mL PBS 轻轻重悬细胞，3000rpm 离心 5min，去掉液体。重复该步骤 2-3 次，最后一次去除上清，样品放-80°C保存备用或直接进行 ChIP 实验。

注：细胞沉淀尽量将上清液彻底吸干再保存。

### 需要的额外材料：

#### 试剂：

ChIP 级别目的抗体

37%甲醛溶液

PBS 溶液

甘氨酸

酚氯仿 DNA 抽提试剂（饱和酚：氯仿：异丙醇=25:24:1）或 DNA 提取试剂盒

Q-pcr 检测试剂

建库试剂（ChIP-seq 需要）

#### 仪器耗材：

匀浆器（组织样本使用）

旋转孵育器

q-PCR 仪

低温离心机

磁力架（ChIP-seq 建库使用）

核酸凝胶电泳仪

凝胶成像仪

## ChIP 实验步骤

### A、裂解细胞（去除细胞质成分）

- 1.准备好上述交联好的细胞。如果是冻存的，需在冰上解冻；
- 2.加 1-1.5 mL cell lysis buffer（SCD-1）重悬细胞沉淀，置于冰上裂解 10min；（破坏细胞膜）
- 3.4° C 3000rpm 离心 5min，去除上清。再加入 500uL cell lysis buffer（SCD-1）重悬沉淀，然后 3000 rpm 4°C 离心 2.5min，去上清；

## B、染色体断裂

### 酶解法：

1. 加入预冷的 250uL MNase digestion buffer (SCD-5)，每 250uL MNase digestion buffer 用于  $3-4 \times 10^6$  个细胞，用枪头轻轻重悬沉淀；

注：消化 buffer 里面没有洗涤剂，细胞重悬起来会比较黏，因此我们要慢慢吹打混匀细胞沉淀

2. 用 MNase digestion buffer (SCD-5) 稀释 MNase (SCD-14) 至原浓度的 1/10；

3. 将 10uL 稀释的 MNase 加入离心管样本中混匀，37℃，1000rpm 旋转孵育 15min。在这一过程中，约 90% 的染色质被消化成单一核小体。（如果细胞浓度较高，可适当加多 10x 稀释的 MNase），孵育完成后，样本放 4℃ 保存备用；

注：一次 250uL 染色体断裂的细胞裂解液可以分为 input，target 组（或阳性对照组），IgG 组，即两个反应的量。如果同时做目的抗体和阳性对照，只需做一个 IgG 阴性对照。

4. 检测染色质断裂情况：取 10uL 样本，加入 90uL Elution buffer (SCD-3)。65℃ 孵育 2h，加入 2uL 蛋白酶 K (SCD-10)，孵育 1h。酚氯仿或 DNA 纯化试剂盒提取 DNA，2% 凝胶电泳检测打断结果。

注：不同细胞类型染色体断裂的程度会有所差别，可能需要根据断裂情况适当减少或增加酶解时间和酶的用量。打断的 DNA 片段长度在 100-1000 的范围，最好在 100-500 之间。

## C、抗体孵育

1. 按下表配制样品体系

表 2 每个 IP 管中加入

试剂	用量
断裂染色质	100uL
ChIP buffer	900uL
总体积	1mL

2. 每组断裂染色质样本取 10% 放入新的离心管中，即 10uL 作为 Input 于 -20℃ 保存；

3. 向每个 IP 管中加入 5uL 阴性抗体 IgG (SCD-15)、5uL 阳性对照抗体 H3K27ac (SCD-16) 或目的抗体 5ug (自备)，4℃ 旋转孵育过夜；

注：目的抗体进行 IP 前建议先进行 WB 检测，确认抗体是否失效以及目的蛋白的表达情况。如果目的蛋白是组蛋白等结合 DNA 较多的蛋白，可以适当减少抗体用量至 2.5ug，如果目的蛋白是结合 DNA 较少的蛋白可以适当增加抗体和细胞用量。

## D、磁珠的准备和孵育

**注：**磁珠不要冷冻或者干燥。

1. 标记实验所需的 1.5mL EP 管，包括目的抗体组，阴性对照抗体 IgG 组；
2. 上下颠倒重悬磁珠（SCD-11），吸取 30uL 磁珠悬液于每个 1.5mL EP 管中，瞬时离心，去上清；
3. 每管加入 500uL ChIP Buffer（SCD-2），轻微上下颠倒混匀清洗磁珠；
4. 3000rpm 离心 1 min，去上清，放冰上备用；
5. 向清洗后的磁珠中加入过夜孵育的抗体-染色质复合物，4℃ 旋转孵育 4-6h；
6. 3000rpm 离心 1min，去掉上清；

#### E、清洗

1. 加入 1mL ChIP Buffer（SCD-2）清洗 beads，4° C 翻转 5min，4° C 3000rpm 2min，去上清；
2. 加入 1mL Low salt buffer（SCD-6）清洗磁珠，4° C 翻转 5min，4° C 3000rpm 2min，去上清；
3. 加入 1mL High salt buffer（SCD-7）清洗磁珠，4° C 翻转 5min，4° C 3000rpm 2min，去上清；
4. 加入 1mL LiCl buffer（SCD-8）清洗磁珠，4° C 翻转 5min，4° C 3000rpm 2min，去上清；
5. 加入 1mL TE buffer（SCD-9）清洗磁珠，上下轻微颠倒混匀，4° C 3000rpm 2min，去上清；

#### F、DNA 纯化

1. 从-20℃取出 input（冰上缓慢解冻），以及 IP 组，每组中分别加入 120uL Elution buffer，室温旋转孵育 30min；
2. 加入 5uL 5M NaCl（SCD-4），65℃水浴孵育 2h；
3. 加入 5uL 蛋白酶 K（SCD-10），60℃水浴孵育过夜；
4. 3000rpm 离心 1min，转移上清到新的离心管中；
5. 酚氯仿或 DNA 纯化试剂盒纯化 DNA。

**方法 1 酚氯仿抽提 DNA 方法：**（饱和酚：氯仿：异丙醇=25:24:1）

为了减少 DNA 产物损失，可以在蛋白酶 K 消化完之后再补充加入 200uL Elution buffer 之后再离心转移上清到新离心管中。

1. 上清中加入等体积的酚氯仿抽提混合液，涡旋振荡 10s 混匀，然后静置 5min，再

1, 2000rpm 离心 15min。

2. 离心后小心吸取上层水相至新的离心管中，加入 2.5-3 倍体积的无水乙醇混匀，放在 -20 摄氏度过夜沉淀 DNA。（可加入 1uL 糖原帮助核酸沉淀）

**注：**用酚氯仿抽提 DNA 过程中，要小心吸取上清，避免吸到下层有机相

3. 第二天 1, 2000rpm 离心 15min 后小心去除上清，再用 75%乙醇重复洗沉淀 3 次，尽量完全去除上清，开盖晾干（约 3min），加入 15 至 20uL 水溶解产物。

**注：**乙醇沉淀 DNA 后要小心移除上清，防止 DNA 丢失

**方法 2 DNA 纯化试剂盒纯化 DNA:**按其试剂盒说明书操作。

获得的 DNA 可进行 q-pcr 检测和高通量测序。

### q-pcr 检测注意事项：

1. 为了保证单一变量，input 组、目的抗体组（或阳性抗体组）、IgG 组获得的 DNA 产物最终用相同体积的水溶解，并且在 q-pcr 检测时用相同体积进行，不要测浓度之后把产物浓度调平。

2. q-pcr 引物设计建议上下游引物扩增的序列长度在 150bp 以内，最好是 100bp 左右。阳性对照体系引物为 GAPDH promoter 引物。

2. input 组一般是取 10% 的量提取的 DNA，q-pcr 的到的 Ct 值是 1/10 底物的数据，计算时 Ct 要减去 3.3。

### 3. Q-pcr 结果计算示例：

$$\Delta Ct [\text{normalized IP}] = (Ct [\text{IP}] - (Ct [\text{Input}] - \text{Log}_2 (\text{Input Dilution Factor})))$$

$$\% \text{ Input} = 2^{(-\Delta Ct [\text{normalized IP}])} * 100\%$$

我们的 input 通常去总量的 1/10，即稀释了 10 倍， $\text{Log}_2 (\text{Input Dilution Factor}) \approx 3.3$

计算示例：

	input	H3K27ac
GAPDH	14.05	17.55

$$\Delta Ct = 17.55 - (14.05 - 3.3) = 6.8 \quad \% \text{input} = 2^{(-6.8)} * 100\% = 0.9\%$$

阴性对照组与目的组计算方法一样，最后比较目的组和阴性对照组的相对捕获量。

### 高通量测序注意事项：

1. 高通量测序一般测 input 组和 target 组的 DNA 产物，input 归一化处理作为 target 组捕获

DNA的基准线;

2. ChIP-seq文库构建可以使用进口的KAPA或者国产诺唯赞的DNA建库试剂盒,相关试剂盒信息如下:

KAPA: KAPA HyperPrep Kits (roche.com) 货号KK8500

诺唯赞: VAHTS Universal DNA Library Prep Kit for Illumina V3 货号ND607

3. ChIP-seq的DNA要求: 不同蛋白结合的DNA量不同,建库的DNA起始量参考建库试剂盒说明,一般普通转录因子捕获的DNA总量5-20ng左右,组蛋白捕获的DNA总量50-200ng左右,如果捕获的DNA量过多可能是非特异性结合多,如果捕获的DNA过少可能是结合的少或实验失败,过少的DNA量会导致建库失败以及测序的有效数据量少。

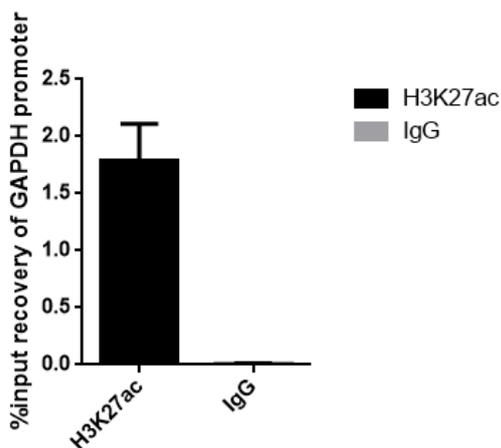
4. 赛诚生物提供DNA建库、高通量测序及生信分析全套服务,如有需要,欢迎咨询。

## 实验结果展示:

### 阳性体系 Q-PCR 检测:

阳性: QPCR 检测蛋白 H3K27ac 对 GAPDH promoter 的富集;

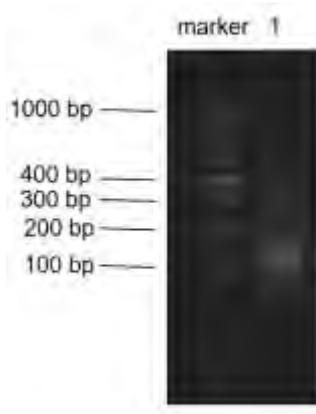
阴性: QPCR 检测蛋白 IgG 对 GAPDH promoter 的富集.



一般 ChIP 阳性对照体系 H3K27ac 组与 IgG 组结合 GAPDH 启动子差异在 2 个 Ct 值以上。

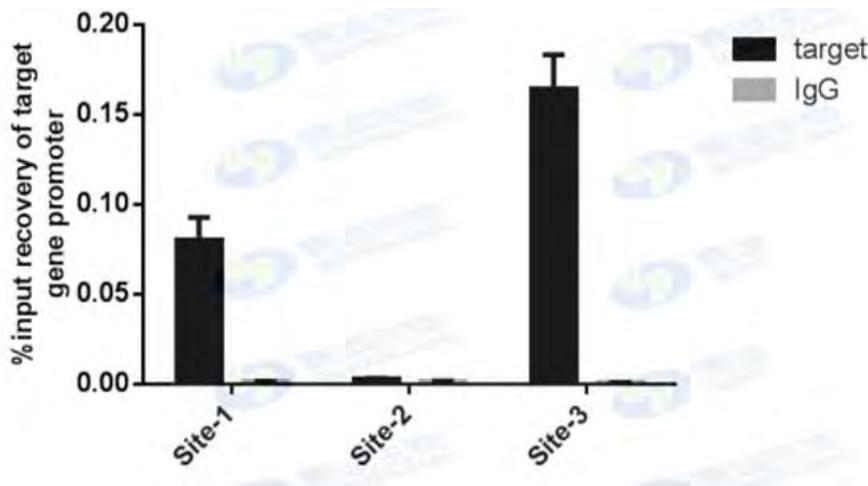
### ChIP-qPCR 实验案例:

#### 染色体断裂图:



ChIP 实验要求染色体断裂的 DNA 片段在 100-1000bp 之间，后续如果要进行高通量测序片段大小最好在 100-500 之间。

ChIP-qPCR 结果柱状图：



通过 ChIP-qPCR 验证转录因子与靶标基因启动子的结合位点，转录因子 A 与 gene-B 启动子的结合，通过信息学预测出 3 个可能的结合位点，然后通过 ChIP-qPCR 检测，结果表明位点 1 和位点 3 都有该转录因子的结合，位点 3 结合最多，而位点 2 不结合。

### 问题解决方案：

问题	解决方案
染色质打不断	交联时间过长
	断裂处理时间太短
染色质消失	交联时间过短
	酶解时间太长，染色质打断太碎
	蛋白酶 K 失效，DNA 无法与蛋白分离

DNA 获取量低	被检测蛋白表达量较少，可适当增加细胞量
	交联时间过短，蛋白从 DNA 上滑落
	去掉高盐 buffer 换为两次低盐 buffer 洗涤
	检查抗体是否是 ChIP 级别的
结果差异较小（假阳性太多）	增加细胞量与磁珠抗体的比率。
	增加高盐洗涤次数
	检查抗体是否是 ChIP 级别的