

ChIP-IT High Sensitivity[®]

(第六版)

货号: **53040**

Active Motif 中国

地址: 上海市闵行区浦江镇万康路 290 号

电话: (86)-21-20926090

邮箱: techchina@activemotif.com

版权所有 2016 Active Motif. Inc

本手册中的信息如有更改，恕不另行通知，也不构成 **Active Motif, Inc.** 的承诺。本手册按“原样”提供，无任何明示或暗示的担保。本手册中的信息可随时更改或更新。

未经 **Active Motif, Inc.** 事先书面同意，不得复制、转让、再复制、披露或复制本文件的全部或部分内容。本文件为专有信息，受美国版权法和国际条约的保护。

本文件的制造商为 **Active Motif, Inc.**

© 2016 Active Motif, Inc., 地址：1914 Palomar Oaks Way, Suite 150; Carlsbad, CA 92008。版权所有。

此处引用的所有商标、商号、服务标志或徽标均属于其各自的公司。

目录

概述.....	1
操作流程图.....	2
试剂盒结果展示及优势.....	3
试剂盒组分和储存条件.....	6
额外所需材料.....	7
实验方案 — 染色质的片段化.....	11
A. 细胞的固定.....	11
B. 细胞的超声打断.....	12
C. 新鲜或冷冻组织的固定.....	15
D. 组织染色质的超声处理.....	16
实验方案 — 染色质免疫沉淀.....	19
E. 免疫沉淀.....	19
实验方案 — ChIP DNA 的纯化.....	21
F. 解交联和 DNA 纯化.....	21
实验方案 — ChIP DNA 的分析.....	22
G. 定量 PCR (qPCR).....	22
H. ChIP-Seq.....	23
附录.....	25
I. qPCR 引物设计和数据分析.....	25
J. 故障排除指南.....	27
K. 相关产品.....	29

概述

染色质免疫沉淀 (ChIP) 是研究蛋白质与 DNA 相互作用的有力工具, 包括转录因子、共调节蛋白、组蛋白修饰、染色质修饰酶和聚合酶。这是因为它能够识别与特定 DNA 位点结合的蛋白质的定位。当在全基因组水平 (如 ChIP-Seq 或 ChIP-chip) 进行分析时, 可以深入了解基因调控、基因表达、染色质修饰机制和途径分析。

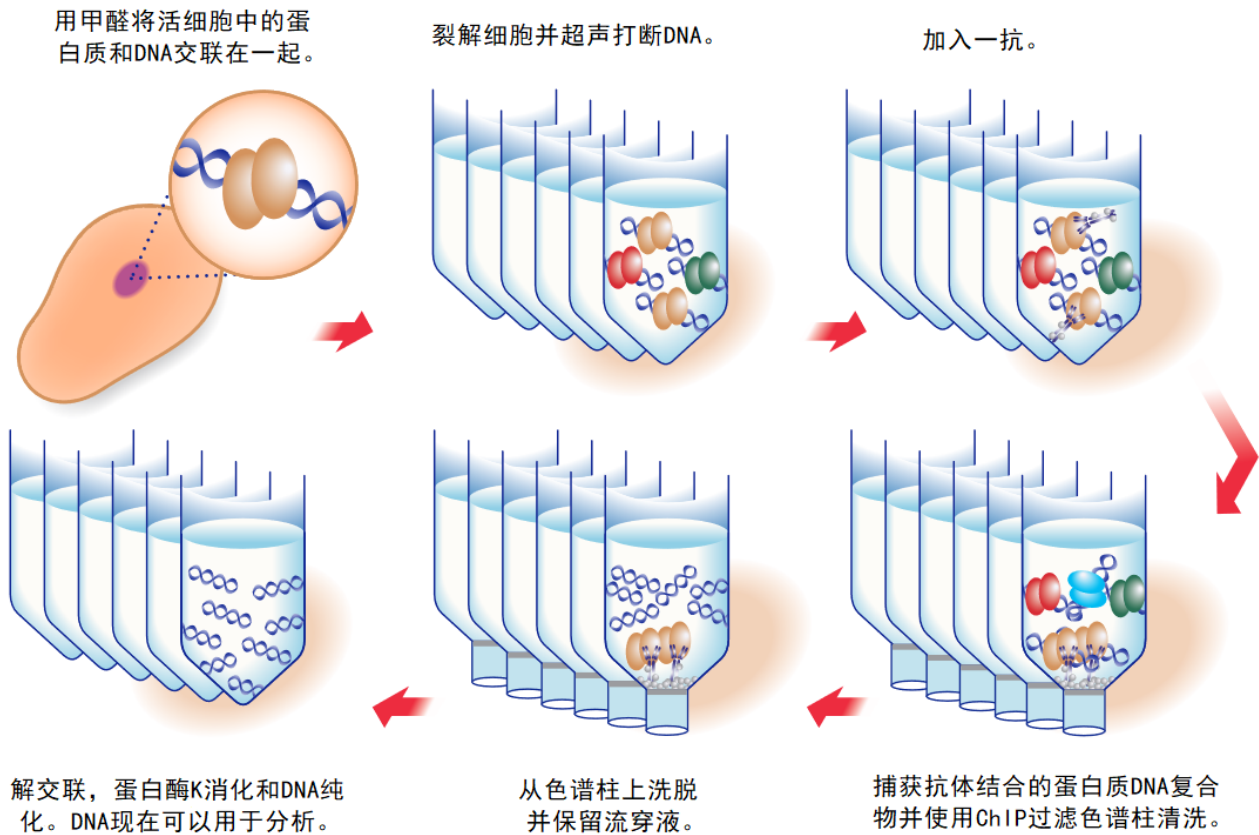
然而, ChIP 的技术要求很高。该方法需要高质量的抗体来识别经过固定的目标结合蛋白质, 以及沉淀抗体/染色质复合物 (通常利用 protein A 或 G 磁珠) 的有效方法。此外, 还需要专用缓冲液、抑制剂和封闭试剂, 以尽量减少非特异性富集和蛋白质降解。

Active Motif 的 ChIP-IT High Sensitivity[®] 试剂盒旨在克服这些障碍, 并提供最高质量的 ChIP 富集 DNA。ChIP-IT High Sensitivity 的实验方案可用于具有挑战性的抗体。这些抗体在其他 ChIP 实验方案中没有得到富集信号, 而通过 ChIP-IT High Sensitivity 的实验方案可以产生足够灵敏的信号。ChIP-IT High Sensitivity 的实验方案甚至可以检测低丰度转录因子的特异结合。提高灵敏度的一个重要组成部分是优化 ChIP 缓冲液, 减少非特异性 DNA 的结合, 以降低背景水平, 从而得到更好的富集结果。此外, 该试剂盒在多种样品类型中具有良好的重复性, 免疫沉淀反应可在 1000 个细胞中进行。高灵敏度 ChIP 的灵敏度提高和背景水平降低是 ChIP-Seq 的理想选择。因此, 在投入时间和金钱进行昂贵的下游基因组分析之前, 请确保您的浓缩 DNA 质量最高。

ChIP-IT High Sensitivity 试剂盒含有足够的试剂来进行 16 次染色质的制备和免疫沉淀反应。这里定义染色质制备为一个 15 厘米的细胞培养皿或 100 毫克的组织样本。我们建议将 ChIP-IT High Sensitivity 试剂盒和 ChIP-IT[®] qPCR Analysis 试剂盒结合使用来进行全面的数据分析。如需了解 ChIP-IT[®] Control 试剂盒、对照 qPCR 引物组、ChIP-Seq 验证抗体或 Active Motif 的 EpiShear[™] 的超声仪器, 请访问 www.activemotif.com/chip。

产品名称	规格	货号
ChIP-IT High Sensitivity [®]	16 rxns	53040
ChIP-IT [®] qPCR Analysis 试剂盒	10 rxns	53029

操作流程图



ChIP-IT High Sensitivity 实验方案的流程图

在 ChIP-IT High Sensitivity 实验方案中，完整的细胞用一种特殊配方的甲醛缓冲液固定，这种缓冲液可以交联并保持蛋白质/DNA 的相互作用。然后用超声波将 DNA 打断成小片段，并与靶向感兴趣的 DNA 结合蛋白的抗体一起孵育。抗体结合的蛋白质/DNA 复合物通过使用 protein G 琼脂糖珠进行免疫沉淀，并通过重力过滤洗涤。免疫沉淀后，解交联，用蛋白酶 K 去除蛋白质后，DNA 被回收和纯化。ChIP 富集的 DNA 可用于基因特异性分析或全基因组分析。

试剂盒结果展示及优势

ChIP-IT High Sensitivity 的优势:

- 适用于低丰度转录因子或低结合亲和力抗体
- 可从 1,000 个细胞中敏感地富集高丰度的目标蛋白，从 50,000 个细胞中敏感富集低丰度的转录因子
- 优化的试剂可降低非特异性结合引起的背景
- 基于过滤的清洗方式是可供选择的最简单方案，可提高多样品实验的一致性
- 已在多种样本类型中验证了其实验流程的高度稳定性，在 qPCR 和 ChIP-Seq 分析中均证明了其性能的优异

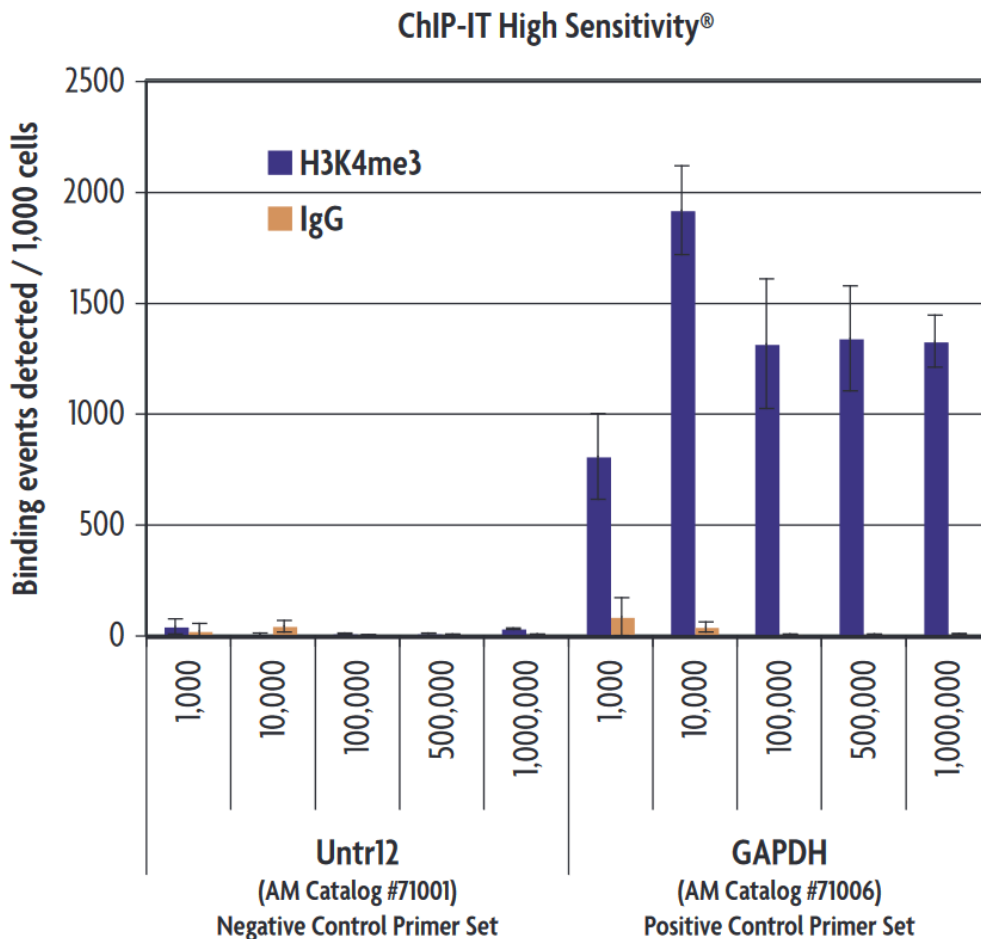


图 1: ChIP-IT High Sensitivity 试剂盒的免疫沉淀灵敏度。

MCF-7 染色质的制备是根据本手册使用 10 万到 400 万个细胞制备的。然后使用 Active Motif 的组蛋白 H3K4me3 抗体（货号 39915）和阴性对照 IgG 对指定数量的细胞进行免疫沉淀反应。富集后，使用 ChIP-IT qPCR Analysis 试剂盒（货号 53029）进行 qPCR 分析，以使数据标准化并可直接比较结果。结果显示，ChIP-IT High Sensitivity 试剂盒可从 1000 个细胞中较强地富集 H3K4me3 DNA 的结

合，而阴性对照 IgG 几乎没有检测到非特异性结合。Untr12 是第 12 号染色体上的一个沉默基因，不应该有任何 H3K4me3 的富集，而 GAPDH 是一个与 H3K4me3 存在相关的活跃转录基因。数据展示的是根据反应中染色质数量、重悬体积和引物效率调整后的原始数据三次平行重复实验的每 1000 个细胞中检测到的富集的平均值。这种计算提供了数据分析的一致性，并可在样本和实验之间进行直接比较。要将此刻度转换为 ChIP Input 回收率的百分比，请将数值除以 1000。

Comparison of ChIP Kits Targeting Low Abundance Transcription Factors

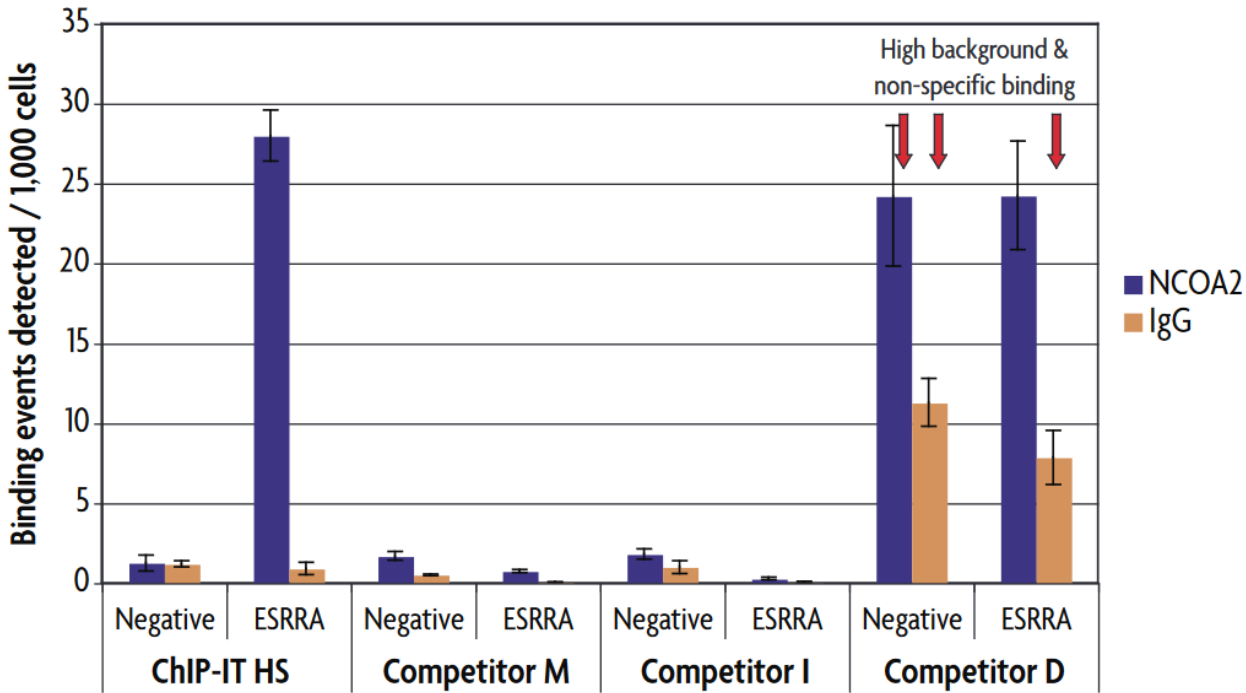


图 2: ChIP-IT High Sensitivity 可以检测低丰度的蛋白质靶点。

MCF-7 染色质是根据每家试剂盒生产厂家的建议从 1.5×10^6 个细胞中制备的。使用针对低丰度 NCOA2 蛋白的抗体和阴性对照 IgG 进行 ChIP，按照试剂盒制造商建议的最佳染色质数量进行实验。富集后，使用 ChIP-IT qPCR Analysis 试剂盒（货号 53029）进行 qPCR，以使染色质数量和 ChIP 体积的数据标准化，以便直接比对同类型试剂盒结果。NCOA2 的抗体一直被认为难以应用于 ChIP 实验，但利用 ChIP-IT High Sensitivity 试剂盒，在雌激素相关受体 α (ESRRA) 启动子处能检测到 NCOA2 结合，其富集度约为阴性对照引物组和 IgG 的 20 倍。NCOA2 要么根本没有富集（竞争对手 M&I），要么富集是非特异性的并且阴性引物组和 IgG 中可见高背景（竞争对手 D）。数据表示每 1000 个细胞进行三次平行结合实验的平均值。要将此刻度转换为 ChIP Input 回收率的百分比，请将数值除以 1000。

方案概述和所需时间表

	所需时间
细胞或组织的固定和裂解	1.5 小时
染色质超声	每个样本 15 分钟
染色质大小的评估*	4.5 小时 (细胞) 过夜 (组织)
免疫沉淀	过夜孵育
结合蛋白质 G 琼脂糖珠	3 小时
清洗免疫复合物	20 分钟
解交联	2.5 小时
DNA 纯化	15 分钟
qPCR 分析	2 小时

*细胞和组织样品的处理方式不同。

试剂盒组分和储存条件

请在下表所示的温度下储存每个试剂盒组分。收到试剂盒后，请将 **Protein-G** 磁珠保存于 4°C，不要再次冷冻。

试剂	容量	储存条件
RNase A (10 µg/µl)	40 µl	-20°C
蛋白酶 K (10 µg/µl)	200 µl	-20°C
Blocker	100 µl	-20°C
5 M NaCl	400 µl	室温
100 mM PMSF	500 µl	-20°C
蛋白酶抑制剂 (PIC)	500 µl	-20°C
沉淀缓冲液	1.5 ml	-20°C
核酸载体	35 µl	-20°C
TE pH 8.0	2 x 1.5 ml	室温
去污剂	25 ml	室温
10X PBS	120 mL	-20°C
固定缓冲液	2 x 1.5 ml	4°C
终止液 (Stop Solution)	20 ml	室温
染色质准备缓冲液	85 ml	室温
ChIP 过滤色谱柱	16 个	室温
ChIP 缓冲液	35 ml	室温
清洗缓冲液 AM1	100 ml	室温
洗脱缓冲液 AM4	2 x 1.5 ml	室温
蛋白质 G 琼脂糖珠*	500 µl	4°C
DNA 纯化结合缓冲液	50 ml	室温
3 M 醋酸钠	500 µl	室温
DNA 纯化清洗缓冲液**	10 ml	室温
DNA 纯化洗脱缓冲液	5 ml	室温
DNA 纯化色谱柱	16 个	室温

*蛋白质 G 琼脂糖珠不可反复冻融。蛋白质 G 琼脂糖珠应在 4°C 条件下保存。

**使用前需要添加无水乙醇。

额外所需材料

- 针对研究目标蛋白质的 ChIP 验证抗体
- 带有小间隙杵的 Dounce 均质器（例如 Active Motif 货号 40401 和 40415）以及紧致适配的“A”杵）。打断染色质时需要使用均质器。
- 含 10-15% 甲醇的 37% 甲醛溶液，以防止聚合（例如 Sigma-Aldrich 货号 252549）。不要使用多聚甲醛。
- 组织制备需要饱和苯酚（DNA 纯化，分子生物学等级，Amresco 货号 0945）
- 组织制备需要氯仿/异戊醇（24:1）（DNA 纯化，分子生物学等级）
- 100% 乙醇
- 70% 乙醇
- 水（无核酸酶）
- 培养板的旋转台
- 置于 4°C 的旋转摇床（例如 Barnstead/Thermolyne 公司的 Labquake，适用于 1.5 ml 微型离心管的管座）
- 离心机（台式 4°C 离心机）和离心管
- 250 µl PCR 管
- Thermocycler
- 15 和 50 ml 离心管
- 测定核酸浓度的超微量紫外可见分光光度计
- 移液器和枪头（建议使用带滤芯枪头）
- 超声打断仪（例如 Active Motif 的 EpiShear™ 超声打断仪带有 1/8” 探头（货号 53051）以及 EpiShear™ 冷却超声打断仪（货号 53080））
- 琼脂糖凝胶电泳仪
- 刀片（用于组织处理）
- 组织处理的手持匀浆器（例如 Biospec Products 的 Tissue-Tearor）
- 细胞刮刀
- （可选）ChIP-IT qPCR Analysis 试剂盒（货号 53029）
- （可选）用于富集分析的基因特异性 qPCR 引物对；参考附录 I
- （可选）SYBR Green qPCR master mix（Bio-Rad 货号 170-8882）

实验方案 — 实验设置

开始实验前请阅读整个实验方案！

细胞生长推荐方案

当计划一个实验时，请计算您将需要准备的染色质总量，并确定您计划对每个准备的染色质进行的ChIP的数量。一定要在计算中包括适当的阳性和阴性ChIP对照反应。另外，请注意，如果您希望分析特定化合物或培养条件对转录因子/DNA相互作用的影响，您应该从对照（未处理）细胞中制备染色质作为参考样本。用于染色质制备的最小推荐细胞数为10万个细胞。

	24 孔板	12 孔板	6 孔板	60 mm 培养皿	100 mm 培养皿	150 mm 培养皿
接种密度	0.05×10^6	0.1×10^6	0.3×10^6	0.8×10^6	2.2×10^6	5.0×10^6
70-80%密度时细胞量*	0.15×10^6	0.3×10^6	0.9×10^6	2.4×10^6	6.6×10^6	15.0×10^6
培养基体积	1 ml	2 ml	3 ml	5 ml	10 ml	20 ml
细胞固定液	100 μ l	200 μ l	300 μ l	500 μ l	1 ml	2 ml
终止液 (Stop Solution)	55 μ l	110 μ l	165 μ l	275 μ l	550	1.1 ml
PBS 清洗缓冲液 (PBS Wash Buffer) (每个皿)	500 μ l	500 μ l	1 ml	2 ml	5 ml	10 ml
染色质准备缓冲液	500 μ l	500 μ l	1 ml	2 ml	5 ml	5 ml
ChIP 缓冲液	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l

*在细胞板和培养皿上的细胞数量会随着细胞类型的不同而变化。这张表参考了HeLa细胞的使用量。请根据您的特定细胞类型进行调整。

**有关缓冲液准备的完整详细信息，请参阅以下说明。

缓冲液准备

完整的细胞固定溶液

每次实验前应准备新鲜的缓冲液。每20 ml细胞培养基需要2.5 ml完整的细胞固定液，在15 ml离心管中加入1.57 ml无菌水和180 μ l固定缓冲液。使用适当的预防措施（即护目镜、手套和实验服）后，向离心管中添加750 μ l 37%甲醛并旋涡混合。每盘使用1/10的生长培养基的固定液。完整的细胞固定液可在有血清或无血清的情况下加入细胞培养基中。

完整的组织固定溶液

每次实验前应准备新鲜的缓冲液。每个待处理组织样品需要 10 ml 组织固定溶液，在 15 ml 离心管的 8.7 ml 无菌水中加入 1 ml 10X PBS。使用适当的预防措施（如护目镜、手套和实验服）后，向离心管中添加 280 μ l 37% 甲醛，并涡旋混匀。

终止液（Stop Solution）

已提供，即开即用。对于细胞来说，使用 1/20 培养基的用量；对于组织来说，每 10 ml 完整组织固定液中加入 515 μ l。

PBS 清洗缓冲液（PBS Wash Buffer）

每 15 cm 培养皿的细胞样本或组织样本需要 25 ml PBS 清洗缓冲液。向 50 ml 离心管中添加 21.25 ml 无菌水、2.5 ml 10X PBS 和 1.25 ml 去污剂。通过反复颠倒混合。将 PBS 清洗液放在冰上冷却。PBS 清洗缓冲液可大量制备，4 $^{\circ}$ C 下可保存 6 个月。

100 mM PMSF 和蛋白酶抑制剂（PIC）

在室温下化冻 PMSF 和 PIC，直到完全溶解，大约需要 30 分钟。在使用前，轻柔涡旋，并轻轻的甩管使液体聚集在管底，然后在使用前加入缓冲液中。

染色质准备缓冲液

已提供，即开即用。

ChIP 缓冲液

已提供，即开即用。

DNA 纯化清洗缓冲液

DNA 纯化洗涤缓冲液在使用前需要添加乙醇。乙醇的最终浓度应为 80%。向 DNA 纯化洗涤缓冲瓶中加入 40 ml 新鲜 100% 乙醇。反复倒转。加入乙醇后，缓冲液可在室温下保存。乙醇只需在第一次使用前添加，之后清洗缓冲液即可使用。

3M 醋酸钠

重要的是在使用前检查乙酸钠，以确保盐没有从溶液中析出。一旦乙酸钠加到溶液中，应在室温下储存。

蛋白质 G 琼脂糖珠

提供的琼脂糖珠在使用前需要清洗。按照手册中的说明清洗用于 ChIP 反应的珠子。无需预先封闭珠子或预先清除样品。为了获得最佳效果，轻轻摇动并倒置试管，使琼脂糖珠重新悬浮。珠子沉降速度较快，因此在使用前应重新悬浮。我们建议在移液之前，从移液枪头末端切下 2 毫米，以防止枪头堵塞。一旦解冻蛋白质 G 琼脂糖珠，琼脂糖珠不可再反复冻融，而是应在 4 $^{\circ}$ C 下保存。

建议

ChIP 验证抗体

我们建议每个 ChIP 反应使用 4 μg 抗体，最大体积为 30 μl 。但是，这将根据抗体的亲和力和染色质的质量而有所不同；您可能需要使用更多的特定抗体。ChIP 抗体必须识别与固定后与 DNA 结合和/或其他蛋白质复合的天然蛋白质。许多在其他应用中表现良好的抗体并不一定适用于 ChIP 实验。因此，使用未经 ChIP 验证的抗体进行的 ChIP 必须设置适当的对照（例如 Active Motif 的 ChIP-IT Control qPCR 试剂盒，货号 53026、53027 和 53028）以验证染色质制备和 ChIP 方法。要查看 Active Motif 提供的 ChIP 验证抗体列表，请访问 www.activemotif.com/chipabs。

染色质打断建议

我们建议使用超声打断仪（即 Active Motif 的 EpiShear 超声仪）。它采用直接超声法来制备染色质，以用于 ChIP-IT High Sensitivity 试剂盒。间接超声系统可能需要更长的超声时间来达到最佳的染色质打断效果。ChIP 实验通常需要将染色质打断到 200-1200 bp 的大小。一般情况下，通过使用较小的打断体积和 V 形底而不是圆底离心管来提高打断效率。另外，请注意，如果染色质样品被气泡乳化，打断是无效的。为了确定你的样品合适的打断水平，设置一个只含有 ChIP 缓冲液的“练习”管。缓慢增加超声振幅，直到开始起泡。稍微降低振幅设置，并将其标记为在不起泡的情况下使用的最高强度。如果染色质制剂不慎乳化，则停止打断，并在离心机中以最大速度在 4°C 下离心 4 分钟，以除去滞留空气。最后，为了防止染色质过热和变性，打断时应尽量将样品放在冰上，打断应不连续进行（即超声处理 20 秒，然后放在冰/水上 30 秒，再次超声处理 20 秒等）。如果可能的话，在冰上打断或者使用 Active Motif 的 EpiShear™ 冷却超声平台（货号 53080）来帮助调节样品温度。

染色质用量

建议每个 IP 反应使用 10-30 μg 染色质（150-450 万个细胞）。然而，在染色质数量有限的情况下，由于从 ChIP-IT High Sensitivity 试剂盒中获得的 DNA 质量较高，可以使用较少的量。对于高丰度蛋白质，我们建议每个 IP 至少用 1000 个细胞，对于低丰度蛋白质，每个 IP 至少需要 5 万个细胞（假设 1.5×10^6 个细胞可产生 10 μg 染色质）。如果 ChIP-Seq 将在浓缩后进行，请在开始实验之前阅读附录 H 列出的建议。

安全注意事项

甲醛和 PMSF 是剧毒化学品。应使用适当的安全预防措施（即护目镜、手套和实验服）。此外，甲醛经吸入具有剧毒性，只能在通风罩内使用。最后，如果染色质是从生物危害性或传染性物质中提取的，则应在生物安全柜中进行染色质超声处理。

实验方案 — 染色质的片段化

A. 细胞的固定

该实验方案描述了一个 15 cm 培养皿（约 1.5×10^7 个细胞）中细胞的固定和染色质的制备。我们建议每个 15 cm 培养皿使用 20 ml 生长培养基。如果使用其他起始细胞量，请参阅第 8 页的试剂配制信息。用于制备染色质的最小细胞数为 10 万个细胞。

1. 在一个 15 cm 培养皿中培养 70-80% 的细胞。可以依据实验设计刺激细胞以激活相应通路。
2. 为每个 15 cm 培养皿制备新鲜的完整细胞固定液。下面列出的体积足以处理一块 15 cm 的培养皿。请参考第 8 页的图表来配制溶液体积。
3. 在现有的细胞培养基中加入 1/10 体积的新制备的完整细胞固定液（例如，20 ml 的生长培养基可使用 2 ml 的完整细胞固定液）来固定细胞。在室温下轻轻摇动 15 分钟。
4. 在现有的细胞培养基中加入 1/20 体积的终止液（Stop Solution），来终止固定反应（例如，20 ml 的生长培养基可使用 1.1 ml 的终止液）。晃动混匀，在室温下孵育 5 分钟。
5. 孵育结束后，将培养皿倾斜，用细胞刮刀将细胞刮下来，收集在培养皿的底部边缘。用移液管将细胞转移到 50 ml 的预冷离心管中。
6. 以 $1250 \times g$ 的离心力在 4°C 下离心 3 分钟。
7. 弃上清。用 10 ml 预冷的 PBS 清洗缓冲液（PBS Wash Buffer）重悬细胞，可上下吹打。重悬后在进行下一步之前，将样品置于冰上。
8. 以 $1250 \times g$ 的离心力在 4°C 下离心 3 分钟，弃上清。用 10 ml 预冷的 PBS 清洗缓冲液（PBS Wash Buffer）再次重悬细胞，可上下吹打。以 $1250 \times g$ 的转速在 4°C 下离心 3 分钟，弃上清。（这一步骤后，细胞可保存于 -80°C ）。
9. 用 5 ml 染色质制备缓冲液（预先添加 $5 \mu\text{l}$ PIC 和 $5 \mu\text{l}$ 100 mM PMSF）重悬细胞沉淀，可上下吹打。
10. 在冰上孵育 10 分钟。
11. 将重悬的细胞沉淀转移到预冷的 Dounce 均质器中。使用紧密配合的杵（A 型）均质化样品 30 次。将均质化后的样品转移到新的 15 ml 离心管中，并以 $1250 \times g$ 的转速在 4°C 下离心 3 分钟。

检测细胞裂解： 为确保细胞裂解，取 $10 \mu\text{l}$ 细胞裂解液，用血球计数板在相差显微镜下观察，以确认细胞核已经释放。在裂解步骤前后观察细胞通常是有帮助的，因为这样可以更容易地识别细胞核和整个细胞。完整的细胞应该有一个黑暗的中央区域（细胞核），周围有一个密度较低的细胞质晕。在裂解的细胞中，细胞核会呈现为被不对称碎片包围的圆点。如果细胞没有被溶解，那么在冰上再打 10 下，或者直到细胞被裂解。

12. 移除并丢弃上清液。每个细胞沉淀样本加入 500 μ l ChIP 缓冲液（预先添加 5 μ l PIC 和 5 μ l 100 mM PMSF）。将重悬液转移到一个新的 2 ml 离心管中。
13. 在冰上孵育 10 分钟。继续进行步骤 B：细胞的染色质超声打断检测。

B. 细胞的超声打断

下面的章节描述了用超声波打断染色质的方案。超声检测结果可能因细胞类型和所使用的超声设备而异。该方案已经过 Active Motif 的 EpiShear™ 超声仪配合保持探头高度和样品之间的温度一致性的 EpiShear™ 冷却超声平台的验证。我们不建议对少于 10 万个细胞和/或 350 μ l 以下体积的样品进行超声处理。

虽然染色质准备缓冲液已经针对免疫沉淀实验进行了优化，但是由于缓冲液的组分独特，需要对超声的条件进行优化。为了保证实验的高灵敏度，我们建议使用我们的缓冲液体系，并通过改变超声时间和/或振幅，来实现最优的染色质打断（例如，有些系统可能需要将超声时间增加三倍，以改善染色质打断效率）。在染色质免疫沉淀反应之前，请特别注意我们关于琼脂糖凝胶分析 Input 染色质样品的处理方案，因为许多步骤可能不同于传统的 ChIP 方案，如果不遵循所述方案，可能会导致凝胶图像出现伪影，如第 14 页的图 3 所示。

1. 将含有染色质的 2ml 离心管置于冰上或离心管冷却装置。打开管盖，将超声探头浸入液体中，直到距离管底部约 5 mm。根据所用细胞类型选用经优化的超声设置（见第 10 页的建议）。细胞的建议起始范围为：25% 振幅，脉冲开启 30 秒，关闭 30 秒，总超声波开启的时间为 10 分钟（或总时长 20 分钟）。
2. 在离心机中以最大速度在 4°C 下离心 2 分钟，以沉淀细胞碎片。
3. 将每种染色质制剂中的 25 μ l 转移到 250 μ l 的 PCR 管中，以分析打断效率和对染色质定量。这个样本将被用来作为 Input DNA 样本。
4. 将每个染色质制剂的剩余部分等分到 1.5 ml 离心管中。我们建议对样品按 150 μ l 体积进行等分，并在 -80°C 下冻存。

注意：在进行免疫沉淀步骤之前，应确认超声后染色质的大小。

Input 的制备

5. 在上述步骤 3 中的每个 25 μ l 染色质制备中，添加 175 μ l TE pH 8.0 和 1 μ l RNase A。盖上 PCR 管盖并旋涡混合。
6. 在 37°C 的 Thermocycler 中孵育 30 分钟。
7. 在每个离心管中加入 2 μ l 蛋白酶 K，涡旋混匀。将离心管在 55°C 孵育 30 分钟，然后将温度升至 80°C 继续孵育 2 小时。
8. 将每个染色质 Input 样品转移到 1.5 ml 离心管中。加入 83 μ l 沉淀缓冲液（Precipitation Buffer）、2 μ l Carrier 和 750 μ l 无水乙醇。涡旋混匀并在 -80°C 下静置 30 分钟或静置过夜。

9. 以离心机最大速度在 4°C 下离心 15 分钟。
 10. 小心地去除上清液，注意不要触碰沉淀。用 500 μ l 70%乙醇洗涤沉淀，并以离心机最大速度 4°C 下离心 5 分钟。
 11. 小心地去除上清液，注意不要触碰沉淀。用移液管移走残余的乙醇。打开离心管，风干 10-15 分钟。
 12. 当沉淀风干后，向每个离心管中加入 25 μ l DNA 纯化洗脱缓冲液。在室温下孵育 10 分钟。然后涡旋以确保沉淀充分溶解。这个溶液就是 Input DNA。
 13. 使用 Nanodrop 或其他分光光度计在 260 nm 处测定每个样品的吸光度，以确定每个染色质制剂的 DNA 浓度。按照步骤 14 所述，留出 500 ng DNA 进行分析。将剩余的 Input DNA 保存在 -20°C。
 14. 按照以下说明在琼脂糖凝胶上分析每种染色质制剂。
 - a. 向 18 μ l 无菌水中添加 2 μ l 5 M NaCl 以制备 500 mM NaCl。涡旋混合。
 - b. 将 500 ng Input DNA 转移到 250 μ l PCR 管中，并添加 1 μ l 500 mM NaCl。如有需要，用无菌水调节最终体积至 10 μ l。
 - c. 在 Thermocycler 中，将样品放置于 100°C 下孵育 20 分钟，然后梯度降温到 50°C。
 - d. 从 Thermocycler 中取出 PCR 管并在室温下静置 5 分钟。
 - e. 在每个样品中加入上样缓冲液，并在 1.5%琼脂糖凝胶上跑胶。使用 100bp 和 1kb 的 DNA marker 带来分析染色质的大小。DNA 应在 200-1200 bp 之间出现弥散条带。
- 注意：**用 ChIP-IT High Sensitivity 试剂盒的方案制备的染色质与用传统的 ChIP 方案制备的染色质相比，在琼脂糖凝胶上的条带模式可能不同。但是，这不会影响分析的灵敏度或增加背景信号。请按照上面列出的方案制备 Input DNA。不建议使用另一种解交联的方法或省略在 100°C 下在 NaCl 溶液中孵育 20 分钟的步骤，因为这会导致使 DNA 看起来更大的假象。只要染色质处于建议的 200-1200 bp 范围内，就可以继续进行 ChIP 反应。如果染色质片段不在这一范围内，则需要进一步优化超声条件。
15. 如果染色质制备成功，则可使用按照 B 部分第 4 步储存在 -80°C 下的等分染色质进行 E 部分的 ChIP 反应。

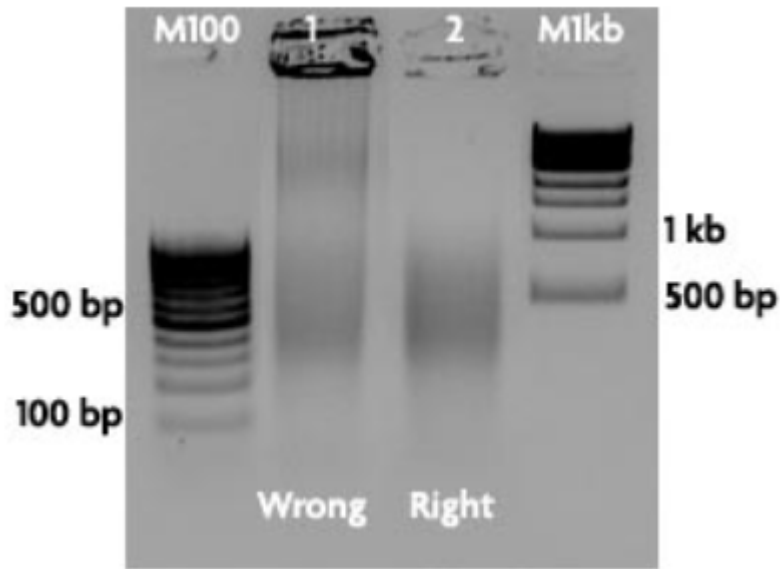


图 3：在 80°C 下解交联 2 小时后染色质打断效率的验证。

MCF-7 细胞染色质经固定后采用 Active Motif 的 EpiShear™ 超声仪和 EpiShear™ 冷却超声平台制备。Input DNA 按照手册第 B 节第 5-13 步制备两份。样品 1 不执行步骤 14（即不添加 NaCl 和在 100°C 下孵育），将 500 ng Input DNA 直接上样到 1.5% 的琼脂糖凝胶上。步骤 14 的省略导致缓冲液伪影，使 DNA 在凝胶上看起来更大。样品 2，按照手册说明进行步骤 14 处理，包括添加 NaCl 和在 100°C 下孵育。在 1.5% 的琼脂糖凝胶上分析 500 ng 的 Input DNA，显示预期的片段在 200-1200 bp 之间。两个样本在凝胶上 DNA 大小的差异说明了在染色质免疫沉淀之前，遵循关于琼脂糖凝胶分析的 Input 染色质处理的方案建议的重要性。关键步骤的遗漏会导致染色质打断效率分析的不准确。如果遵循方案步骤，而 DNA 片段不在推荐范围内，则需要进一步优化超声条件。

C. 新鲜或冷冻组织的固定

本方案描述了 100-400 mg 新鲜或冷冻动物组织中的固定和染色质制备。我们建议对每个样品完成第 1-7 步骤之后再处理下一个样品。

1. 对于组织固定，将 10 ml 完整的组织固定液（见第 9 页的缓冲液配制）转移到 60 mm 培养皿中。将培养皿置于冰上。
2. 在培养皿中放入 100-400 mg 新鲜或冷冻组织样品，确保样品完全浸没。用刀片将组织样本切成小块（大约 1 mm 的立方体）。
3. 将样品和完整组织固定液转移到 15ml 离心管中，并在室温下旋转孵育固定 15 分钟。
4. 在离心管中加入 515 μ l 终止液（Stop Solution），室温下以旋转孵育 5 分钟，停止固定反应。
5. 将离心管放在冰上，用电动组织匀浆器以 30,000 rpm 将组织均质化 45 秒。
6. 以 1250 \times g 的转速在 4 $^{\circ}$ C 下离心 3 分钟。
7. 弃上清。用 10 ml 预冷的 PBS 清洗缓冲液（PBS Wash Buffer）重悬组织细胞，可上下吹打。重悬后在进行下一步之前，将样品置于冰上。
8. 以 1250 \times g 的转速在 4 $^{\circ}$ C 下离心 3 分钟，弃上清。用 10 ml 预冷的 PBS 清洗缓冲液（PBS Wash Buffer）重悬组织细胞，可上下吹打。以 1250 \times g 的转速在 4 $^{\circ}$ C 下离心 3 分钟。移除并丢弃上清液。（这一步骤后，组织细胞可保存于-80 $^{\circ}$ C）。
9. 用 5 ml 染色质制备缓冲液（预先添加 5 μ l PIC 和 5 μ l 100 mM PMSF）重悬组织细胞沉淀。
10. 在冰上孵育 10 分钟。
11. 将重悬的组织细胞沉淀转移到预冷的 Dounce 均质器中。使用紧密配合的杵（A 型）均质化样品 30 次。将均质化后的样品转移到新的 15 ml 离心管中。

检测细胞裂解：为确保细胞裂解，取 10 μ l 细胞裂解液，用血球计数板在相差显微镜下观察，以确认细胞核已经释放。在裂解步骤前后观察细胞通常是有帮助的，因为这样可以更容易地识别细胞核和整个细胞。完整的细胞应该有一个黑暗的中央区域（细胞核），周围有一个密度较低的细胞质晕。在裂解的细胞中，细胞核会呈现为被不对称碎片包围的圆点。如果细胞没有被溶解，那么在冰上再打 10 下，或者直到细胞被裂解。

12. 以 1250 \times g 的转速在 4 $^{\circ}$ C 下离心 3 分钟。
13. 弃上清。用 500 μ l – 1 ml ChIP 缓冲液（预先添加 PIC 和 100mM PMSF）再次重悬组织细胞颗粒。（每 500 μ l ChIP 缓冲液中添加 5 μ l PIC 和 5 μ l PMSF。每 1 ml ChIP 缓冲液中添加 10 μ l PIC 和 10 μ l PMSF。）将组织细胞溶液转移到新的 2 ml 离心管中。
14. 在冰上孵育 10 分钟。进行步骤 D：组织染色质超声处理。

D. 组织染色质的超声处理

下面的章节描述了用超声波打断染色质的方案。由于动物组织中蛋白质和细胞碎片浓度相比于培养的细胞有所增加，我们建议按照该方案制备染色质和组织样本的 Input DNA。超声检测结果可能因组织类型和所使用的超声设备而异。该方案已经过 Active Motif 的 EpiShear™ 超声仪配合保持探头高度和样品之间的温度一致性的 EpiShear™ 冷却超声平台的验证。我们不建议对少于 50 mg 组织和/或 350 µl 体积以下的样品进行超声处理。

虽然染色质准备缓冲液已经针对免疫沉淀实验进行了优化，但是由于缓冲液的组分独特，需要对超声的条件进行优化。为了保证实验的高灵敏度，我们建议使用我们的缓冲液体系，并通过改变超声时间和/或振幅，来实现最优的染色质打断（例如，有些系统可能需要将超声时间增加三倍，以改善染色质打断效率）。在染色质免疫沉淀反应之前，请特别注意我们关于琼脂糖凝胶分析 Input 染色质样品的处理方案，因为许多步骤可能不同于传统的 ChIP 方案，如果不遵循所述方案，可能会导致凝胶图像出现伪影，如第 19 页的图 4 所示。

1. 将含有染色质的 2ml 离心管置于冰上或离心管冷却装置。打开管盖，将超声探头浸入液体中，直到距离管底部约 5 mm。根据所用细胞类型选用经优化的超声设置（见第 10 页的建议）。细胞的建议起始范围为：25% 振幅，脉冲开启 30 秒，关闭 30 秒，总超声波开启的时间为 10 分钟（或总时长 20 分钟）。
2. 在离心机中以最大速度在 4°C 下离心 2 分钟，以沉淀细胞碎片。
3. 将每种染色质制剂中的 25 µl 转移到 250 µl 的 PCR 管中，以分析打断效率和对染色质定量。这个样本将被用来作为 Input DNA 样本。
4. 将每个染色质制剂的剩余部分等分到 1.5 ml 离心管中。我们建议对样品按 150 µl 体积进行等分，并在 -80°C 下冻存。

注意：在进行免疫沉淀步骤之前，应确认超声后染色质的大小。

Input 的制备

5. 在上述步骤 3 中的每个 25 µl 染色质制备中，添加 175 µl TE pH 8.0 和 2 µl RNase A。盖上 PCR 管盖并旋涡混合。
6. 在 37°C 的 Thermocycler 中孵育 1 小时。
7. 在每个离心管中加入 5 µl 蛋白酶 K，涡旋混匀，在 Thermocycler 中 37°C 孵育 3 小时。
8. 在每个离心管中加入 10 µl 5 M NaCl，涡旋混匀，65°C 孵育 6-16 小时来解交联。
9. 从 Thermocycler 中取出 PCR 管，并添加 250 µl 苯酚和 125 µl 氯仿：异戊醇（24:1）。涡旋混匀，在室温离心机中以最大速度离心 2 分钟。

10. 将离心管中的上层水相转移到新的 1.5 ml 离心管中，并添加 250 μ l 氯仿：异戊醇（24:1）。在室温离心机中以最大速度离心 2 分钟。
 11. 将离心管中的上层水相转移到新的 1.5 ml 离心管中，并添加 83 μ l 沉淀缓冲液(Precipitation Buffer)、2 μ l Carrier 和 900 μ l 无水乙醇。涡旋混匀并在-80 $^{\circ}$ C 下静置 30 分钟或静置过夜。
 12. 在离心机中以最大速度在 4 $^{\circ}$ C 下离心 15 分钟。
 13. 小心地去除上清液，注意不要触碰沉淀。用 500 μ l 70%乙醇洗涤沉淀，并离心机中以最大速度在 4 $^{\circ}$ C 离心 5 分钟。
 14. 小心地去除上清液，注意不要触碰沉淀。用移液管移走残余的乙醇。打开离心管，风干 10-15 分钟。
 15. 当沉淀风干后，向每个离心管中加入 25 μ l DNA 纯化洗脱缓冲液。在室温下孵育 10 分钟。然后涡旋以确保沉淀充分溶解。这个溶液就是 Input DNA。
 16. 使用 Nanodrop 或其他分光光度计在 260 nm 处测定每个样品的吸光度，以确定每个染色质制剂的 DNA 浓度。另外留出 500 ng DNA 进行步骤 17 的分析。将剩余的 Input DNA 保存在-20 $^{\circ}$ C。
 17. 按照以下说明在琼脂糖凝胶上分析每种染色质制剂。
 - a. 向 18 μ l 无菌水中添加 2 μ l 5 M NaCl 以制备 500 mM NaCl。涡旋混合。
 - b. 将 500 ng Input DNA 转移到 250 μ l PCR 管中，并添加 1 μ l 500 mM NaCl。如有需要，用无菌水调节最终体积至 10 μ l。
 - c. 在 Thermocycler 中，将样品放置于 100 $^{\circ}$ C 下孵育 20 分钟，然后梯度降温到 50 $^{\circ}$ C。
 - d. 从 Thermocycler 中取出 PCR 管并在室温下静置 5 分钟。
 - e. 在每个样品中加入上样缓冲液，并在 1.5%琼脂糖凝胶上跑胶。使用 100bp 和 1kb 的 DNA 梯度条带来分析染色质的大小。DNA 应在 200-1200 bp 之间出现弥散条带。
- 注意：**用 ChIP-IT High Sensitivity 试剂盒的方案制备的染色质与用传统的 ChIP 方案制备的染色质相比，在琼脂糖凝胶上的条带模式可能不同。但是，这不会影响分析的灵敏度或增加背景信号。请按照上面列出的方案制备 Input DNA。不建议使用另一种解交联的方法或省略在 100 $^{\circ}$ C 下在 NaCl 溶液中孵育 20 分钟的步骤，因为这会导致使 DNA 看起来更大的假象。只要染色质处于建议的 200-1200 bp 范围内，就可以继续进行 ChIP 反应。如果染色质片段不在这一范围内，则需要进一步优化超声条件。
18. 如果染色质制备成功，则可使用按照 D 部分第 4 步储存在-80 $^{\circ}$ C 下的等分染色质进行 E 部分的 ChIP 反应。

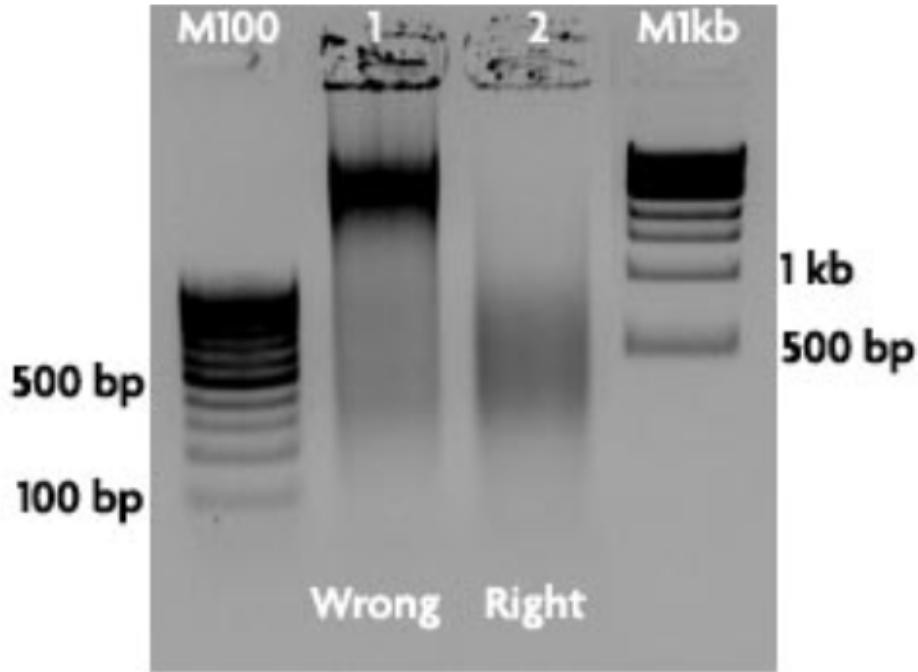


图 4：在 65°C 下解交联过夜后染色质打断效率的验证。

染色质经固定后采用 Active Motif 的 EpiShear™ 超声仪和 EpiShear™ 冷却超声平台制备。Input DNA 按照手册第 D 节第 5-16 步制备两份。样品 1 不执行步骤 17（即不添加 NaCl 和在 100°C 下孵育），将 500 ng Input DNA 直接上样到 1.5% 的琼脂糖凝胶上。步骤 17 的省略导致缓冲液伪影，使 DNA 在凝胶上看起来更大。样品 2，按照手册说明进行步骤 17 处理，包括添加 NaCl 和在 100°C 下孵育。在 1.5% 的琼脂糖凝胶上分析 500 ng 的 Input DNA，显示预期的片段在 200-1200 bp 之间。两个样本在凝胶上 DNA 大小的差异说明了在染色质免疫沉淀之前，遵循关于琼脂糖凝胶分析的 Input 染色质处理的方案建议的重要性。关键步骤的遗漏会导致染色质打断效率分析的不准确。如果遵循方案步骤，而 DNA 片段不在推荐范围内，则需要进一步优化超声条件。

实验方案 — 染色质免疫沉淀

E. 免疫沉淀

染色质免疫沉淀的成功取决于 ChIP 抗体的质量和靶蛋白的丰度。对于高丰度的蛋白质，每个免疫沉淀反应只需要至少 1000 个细胞。对于丰度较低的蛋白质，每次免疫沉淀反应至少需要 5 万个细胞。（ 1.5×10^6 个细胞相当于 10 μg 染色质）

1. 在冰上化冻超声染色质。在 4°C 离心机中以最大速度离心染色质 2 分钟。
2. 按照下表 1 所示的顺序将组分加入 1.5ml 离心管中，以建立 ChIP 反应。一定要根据您的超声染色质的 DNA 浓度来计算使用的体积。我们建议每个 ChIP 反应使用 10-30 μg 染色质（150-450 万个细胞）。如果染色质数量有限，可以使用更少的染色质。
3. 在 1.5 ml 离心管中准备用于 ChIP 反应的抗体。对每种抗体使用单独的离心管。在离心管中加入 5 μl Blocker 和 4 μg ChIP 抗体。（每个反应的抗体体积不应超过 30 μl ）。在室温下培养抗体/Blocker 混合物 1 分钟，然后加入 ChIP 反应。

表 1

试剂	1 个反应
打断染色质（10-30 μg ）	X μl
ChIP 缓冲液	调整到 200 μl
蛋白酶抑制剂（PIC）	5 μl
抗体/封闭液混合物（来自第 3 步）	不要超过 35 μl
最大反应体积	240 μl

4. 盖上管盖，在 4°C 旋转摇床上孵育过夜。
5. 蛋白质 G 琼脂糖珠在使用前需要清洗。将 30 μl 蛋白质 G 琼脂糖珠转移到 1.5 ml 离心管中。加入等量的 TE pH 8.0，颠倒混匀。在离心机中以 1250 \times g 的速度离心 1 分钟。移除相当于加入琼脂糖珠中 TE 体积的上清液。
注意：在吸取蛋白质 G 琼脂糖珠之前，应通过倒置试管使其完全重悬。当用移液管移液时，从移液管末端切下 2 mm，以防止移液管堵塞。
6. 用相同体积的 TE pH 8.0 再次清洗珠子。颠倒混匀。在离心机中以 1250 \times g 的速度离心 1 分钟。移除相当于加入琼脂糖珠中 TE 体积的上清液。蛋白质 G 琼脂糖珠现在可以使用了。
7. 以 1250 \times g 的转速离心 ChIP 反应液 1 分钟，收集管盖内部的液体。
8. 向每个免疫沉淀反应中添加 30 μl 清洗后的蛋白质 G 琼脂糖珠。盖上管盖后，在旋转摇床上 4°C 孵育 3 小时。
9. 为每个 ChIP 反应标记一个 ChIP 过滤柱。从过滤柱底部取下封口，并将其放入一个作为固定器的 1 ml 的空枪头盒（参见下面的图 5）。

10. 取下转子上的 ChIP 反应，并以 $1250 \times g$ 的速度离心 1 分钟，收集管盖上的液体。
11. 在每个 ChIP 反应中加入 $600 \mu\text{l}$ ChIP 缓冲液，然后将整个反应（包括蛋白质 G 琼脂糖珠）转移到其标记的柱上。使其在重力作用下发生流动。
12. 在重力流动过程中，计算洗脱缓冲液的用量，即每个 1.5 ml 离心管准备 $100 \mu\text{l}$ 洗脱缓冲液 AM4。将洗脱缓冲液转移到 1.5 ml 离心管中在 37°C 下预热。
13. 用 $900 \mu\text{l}$ 清洗缓冲液 AM1 清洗过滤柱。静置 3 分钟。
14. 重复步骤 13 四次，一共清洗五次。
15. 将过滤柱转移到新的 1.5 ml 离心管中，并以 $1250 \times g$ 的转速室温微离心 3 分钟，以去除残留的清洗缓冲液。
16. 离心后，将 ChIP 过滤柱转移到新的 1.5 ml 离心管中。向每个柱中添加 $50 \mu\text{l}$ 经 37°C 预热的洗脱缓冲液 AM4。在室温下孵育 5 分钟。以 $1250 \times g$ 的转速在室温下离心 3 分钟。
17. 在相同的微离心管中保留过滤柱，向每个柱中再添加 $50 \mu\text{l}$ 经 37°C 预热的洗脱缓冲液 AM4。在室温下孵育 5 分钟，然后以 $1250 \times g$ 的转速在室温下离心 3 分钟。
18. 丢弃 ChIP 过滤柱。洗脱下来的液体中（体积约 $100 \mu\text{l}$ ）含有 ChIP DNA。继续进行后续第 F 节：DNA 纯化。

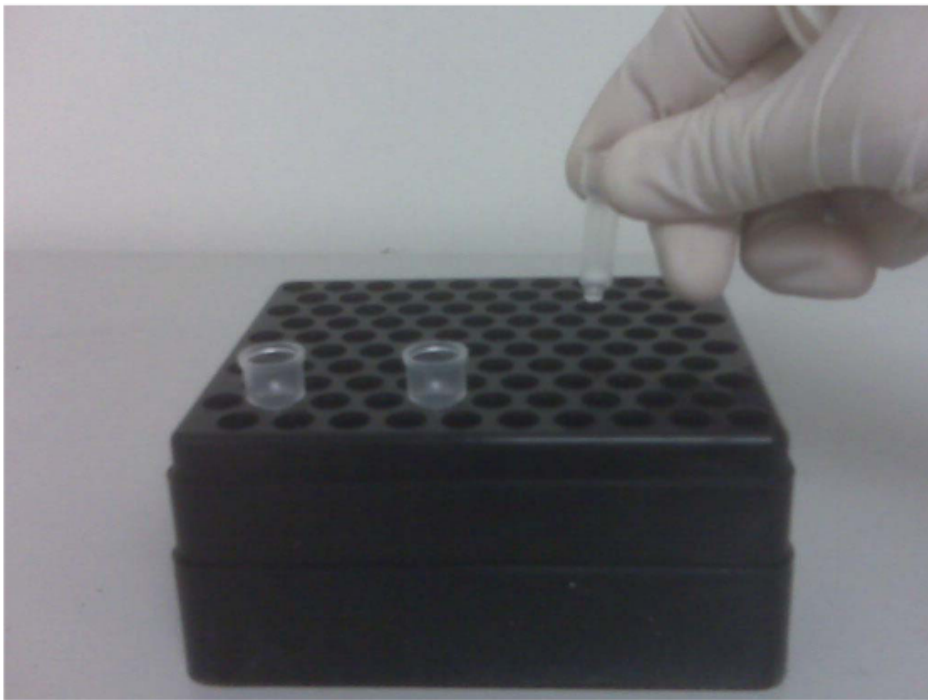


图 5：使用 ChIP 过滤柱。

掰开 ChIP 过滤柱底部的封闭板，将过滤柱放置于 1 ml 的空枪头盒中，以执行清洗步骤。

实验方案 — CHIP DNA 的纯化

F. 解交联和 DNA 纯化

1. 将每个洗脱的 CHIP DNA 转移到 250 μ l PCR 管中, 加入 2 μ l 蛋白酶 K。涡旋混匀后, 在 Thermocycler 中 55 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟, 然后将温度升高到 80 $^{\circ}$ C 继续孵育 2 小时。
2. 将 DNA 转移到 1.5 ml 离心管中, 在每个离心管中加入 5 倍体积 (500 μ l) 的 DNA 纯化结合缓冲液, 并涡旋混匀。用 5 μ l 3M 乙酸钠调节 pH 值。样品应为亮黄色, 以表示 pH 合适。如果您的样品不是亮黄色, 请参考附录中的故障排除指南以详细了解在将样品装入纯化柱之前调整 pH 值的信息。
3. 对于每个样品, 在收集管中放置一个 DNA 纯化柱 (AM#103928), 并将每个 pH 值调整后的样品添加到对应的纯化柱中。盖上纯化柱的盖子, 将其与收集管一起放入离心机中, 并以 14,000 rpm 的转速离心 1 分钟。
4. 从收集管上取下纯化柱, 弃废液后, 将纯化柱放回收集管。
5. 首次使用 DNA 纯化清洗缓冲液前, 请按要求进行准备 (AM#103497)。使用溶液前, 按照第 9 页的说明添加乙醇。每个纯化柱中加入 750 μ l DNA 纯化清洗缓冲液后, 盖上管盖。
6. 以 14,000 rpm 的转速离心 1 分钟。
7. 从收集管上取下纯化柱, 移去流穿液后, 将纯化柱放回收集管。
8. 打开纯化柱的管盖, 以 14,000 rpm 转速离心 2 分钟, 以清除纯化柱上残留的清洗缓冲液。
9. 将纯化柱转移到干净的离心管中。根据用于 CHIP 富集 DNA 下游分析的方法, 使用适当的洗脱体积。对于 CHIP-Seq 或 CHIP-chip 的应用, 我们建议在洗脱前将所需体积的洗脱缓冲液在 37 $^{\circ}$ C 下预热 5 分钟。
 - a. qPCR 分析: 在纯化柱基质中心加入 100 μ l DNA 纯化洗脱缓冲液 (AM#103498), 室温下孵育 1 分钟。在离心机中以 14,000 rpm 离心 1 分钟。再加入 100 μ l DNA 纯化洗脱缓冲液至柱内, 室温下孵育 1 分钟。在离心机中以 14000 rpm 离心 1 分钟。总洗脱体积为 200 μ l。
 - b. 对于 CHIP-Seq 或 CHIP-chip 分析: 向纯化柱基质中心加入 36 μ l 37 $^{\circ}$ C DNA 纯化洗脱缓冲液 (AM#103498), 并在室温下静置 1 分钟。在离心机中以 14,000 rpm 离心 1 分钟。
10. 丢弃纯化柱。纯化后的 DNA 可在 -20 $^{\circ}$ C 下储存以备将来使用。

实验方案 — ChIP DNA 的分析

G. 定量 PCR (qPCR)

ChIP DNA 可以用定量 PCR (qPCR) 对特定的基因水平进行分析。在基因特异性的基础上进行分析。每次分析都应包括阳性对照和阴性对照来确定富集倍数。阴性对照引物将扩增不受相关抗体结合的基因组区域。Active Motif 建议使用 ChIP-IT® qPCR Analysis 试剂盒 (货号 53029) 来分析 qPCR 数据。ChIP-IT qPCR Analysis 试剂盒包含阳性和阴性对照引物、标准曲线 DNA、标准曲线引物和 qPCR 分析电子表格, 用于进行分析计算。Active Motif 的分析策略是确定引物效率, 并根据 Input DNA、引物效率、ChIP 反应中使用的染色质数量和重悬体积对 ChIP 样本的值进行归一化。ChIP-IT qPCR Analysis 试剂盒提供了数据分析的一致性, 并允许在样本和实验之间进行直接比较。如果不使用 ChIP-IT qPCR Analysis 试剂盒, qPCR 数据的归一化和绘图可以使用第 I 节中描述的方法来完成。

1. 下面是一个 qPCR 反应的例子。请按照 qPCR 仪的具体说明进行操作。我们建议使用市售 SYBR Green qPCR master mix (例如 Bio-Rad, 170-8882) 并制备三份平行反应。

试剂	20 μ l PCR 反应
2X SYBR Green master mix	10 μ l
预混引物对 (各 2.5 μ M) *	4 μ l
无菌水	1 μ l
DNA 样本 (ChIP 或者 Input)	5 μ l
总体积	20 μ l

*我们建议将引物设计为在 58°C 的退火温度下进行, 以便所有的 qPCR 反应都可以在相同的条件下进行。建议扩增长度为 75-150 bp。Active Motif 提供了根据这些建议设计的经验证的物种特异性 qPCR 引物 www.activemotif.com/chipprimers。

2. 将 PCR 管放入 qPCR 仪中, 并设定以下程序:

95°C 2 分钟

(95°C 15 秒, 58°C 20 秒, 72°C 20 秒) 40 个循环

3. 如果使用 ChIP-IT qPCR Analysis 试剂盒, 请安试剂盒中的指导步骤进行分析。否则, 请按照第 I 节推荐步骤进行分析。

H. ChIP-Seq

ChIP-IT High Sensitivity 试剂盒已经广泛验证可应用于后续 ChIP-Seq 进行全基因组分析。这个过程包括通过在 DNA 片段末端添加适配序列 (adapter) 来从 ChIP DNA 中制备文库。然后在测序前对文库进行 PCR 扩增和验证。

商用试剂盒可用于制备 ChIP DNA 文库以进行测序。请选择与要使用的测序平台兼容的文库制备试剂盒。

A. 一般性建议

- 我们建议在 ChIP 反应中使用 30 μg 染色质，但如果染色质数量有限或您正在富集高含量组蛋白，则可以使用较少的染色质
- 文库生成通常需要 10 ng ChIP 富集的 DNA。然而，通过使用 ChIP-IT High Sensitivity 试剂盒，富集的 DNA 质量很高，在处理低丰度的转录因子时，可以使用较少的量。（详见下文 B. ChIP-Seq 要求）
- 文库产量应在 1-2 μg 范围内
- 30M 测序读数足以对大多数转录因子和组蛋白修饰进行分析
- 36 bp 单端读长足以实现唯一比对和良好的 ChIP-Seq 数据，尽管可以使用更长的测序读长
- Input DNA 应作为对照反应进行测序，以识别假的“信号峰”，并揭示已复制的基因组区域。从实验峰值中减去输入峰值将有助于消除虚假数据。使用 50 ng Input DNA（对于培养细胞样本，从第 B 节第 12 步开始；对于组织样本，从第 D 节第 15 步开始）用于文库生成。

B. ChIP-Seq 要求

通常建议，由 ChIP DNA 生成的文库需要 10 ng ChIP 富集 DNA。当使用抗组蛋白修饰的良好抗体时，可以获得 10 ng 的 ChIP DNA。然而，对于序列特异性 DNA 结合转录因子来说，10ng 是一个不切实际的数字。使用 ChIP-IT High Sensitivity 试剂盒制备的高质量 DNA，可从亚纳克级的 ChIP DNA 中生成高质量的文库。对于良好的 ChIP-Seq 数据，低背景的高质量富集相比于回收的 DNA 总量更加重要。因此，我们建议使用 Active Motif 的 ChIP-IT qPCR Analysis 试剂盒（货号 53029）对已知的结合位点进行 qPCR 检测，以确认 DNA 质量，而不是量化 DNA。

C. ChIP-Seq 之前的 qPCR

为了进行 qPCR 以验证富集 ChIP DNA 的质量，请遵循第 G 节中 qPCR 的说明，并进行以下修改。由于洗脱体积减小，ChIP DNA 在用于 qPCR 前需要稀释。在 94 μl DNA 纯化洗脱缓冲液 (AM#103498) 中加入 6 μl ChIP DNA。每次 qPCR 反应使用 5 μl 稀释的 ChIP DNA。

适合在 ChIP-Seq 中使用的高质量 DNA 应显示在已知结合位点的富集相比于阴性对照引物有 5 倍的富集（见下图 6）。如果 qPCR 富集度令人满意，则剩余的 30 μl ChIP DNA 可用于文库生成。

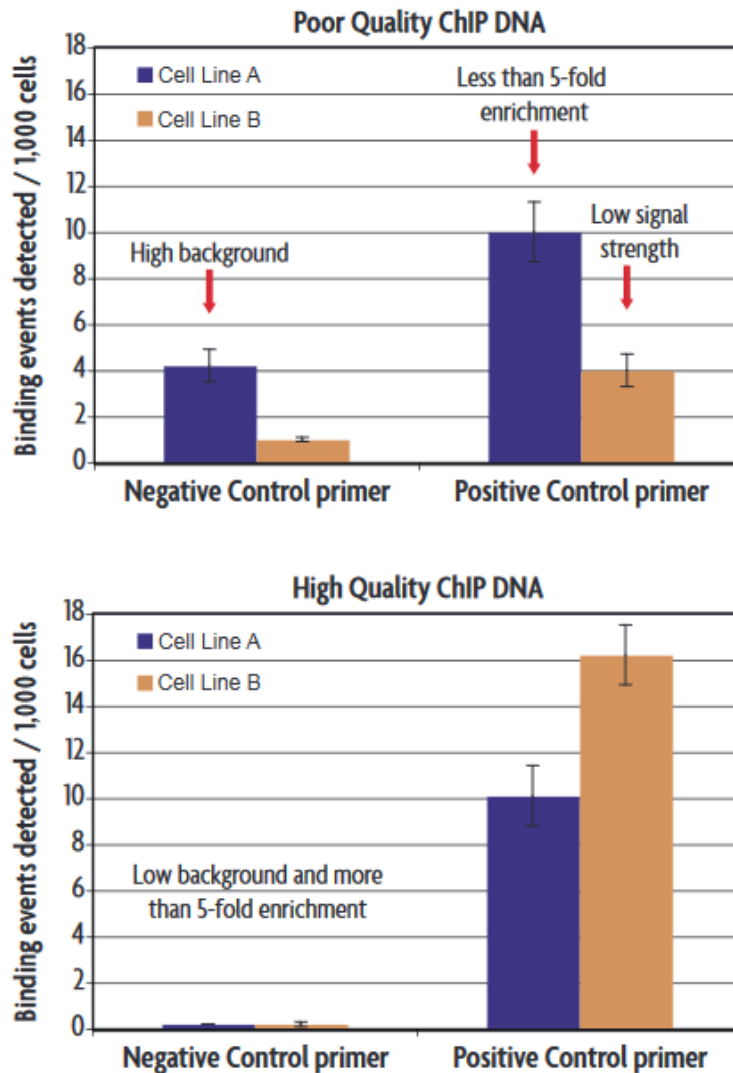


图 6: 相比于阴性对照, 好的富集和差的富集的 qPCR 结果比较。

数据显示的是用 ChIP-IT qPCR Analysis 试剂盒分析 qPCR 的结果, 以人类阴性对照引物作为阴性对照和基因特异性引物作为阳性对照。在上方图中, 为细胞系 A 设置的阴性对照显示了高背景水平, 即每 1000 个细胞检测到的结合事件高于 2, 而细胞系 B 的阳性对照信号水平低于每 1000 个细胞检测到的 5 个结合事件。在下方图中显示的是阴性对照引物组的低背景水平, 即每 1000 个细胞检测到的结合事件低于 2。阳性对照引物组的富集倍数超过 5 倍。只有下方的样本中的 ChIP DNA 才被推荐用于 ChIP-Seq。

D. 文库构建

ChIP-IT High Sensitivity 试剂盒的 ChIP DNA 已通过 Illumina® 平台对 ChIP-Seq 进行了广泛验证。ChIP DNA 可用于使用标准 Illumina® 文库构建方案生成单端或双端文库。商用的文库构建试剂盒可用于生成 NGS 文库。请选择与要使用的测序平台兼容的文库构建试剂盒。

附录

I. qPCR 引物设计和数据分析

A. 引物设计

- 使用 *silico* PCR 程序（如 Primer3, <http://frodo.wi.mit.edu/> 或者 UCSC 基因组浏览器, <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>）设计和分析潜在的引物对。
- 应避免引物二聚体，因为它们会被 SYBR Green 结合，影响准确定量。你可以通过 http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi 网站分析您的引物的自我互补性和二级结构。
- 理想情况下，扩增片段长度应为 75-150 bp。
- 与 ChIP-IT qPCR Analysis 试剂盒一起使用时，引物应设计为在 58° C 下最佳退火，建议长度为 18-22 bp。
- Active Motif 提供 ChIP Control qPCR 引物组，经验证可在我们的 ChIP-IT qPCR Analysis 试剂盒中使用。要查看可用的物种特异性引物列表，请访问 www.activemotif.com/chipprimers。

B. 数据分析

如果不使用 Active Motif 的 ChIP-IT qPCR Analysis 试剂盒进行分析，可使用以下两个简单的方案进行分析。这两个方案都需要在实验中使用已知浓度的 DNA 对每个引物制作标准曲线。

方案 1: 阳性引物对阴性引物的富集倍数

1. 用您的引物对已知 DNA 量的 Input DNA（对于培养细胞样本，从第 B 节第 12 步；对于组织样本，从 D 节第 15 步）进行 qPCR 制作标准曲线，一个点三个平行重复。对三到五个 10 倍梯度稀释的样品（例如 0.005 ng、0.05 ng、0.5 ng、5 ng 和 50 ng）进行 qPCR。
2. 使用阳性对照引物（已知结合位点）和阴性对照引物（基因组中您感兴趣的蛋白质不结合的区域），对 ChIP 和 IgG 样本以及 Input DNA 标准的稀释样本进行 qPCR。
3. 您的 qPCR 仪将根据标准曲线为每个 qPCR 反应赋值。如果你的机器不能自动平均样本的三个平行重复，您需要手动计算这些平均值。
4. 用阳性对照引物组的平均值除以阴性对照引物组的平均值，即可得到您的富集倍数。

方案 2: 相对于 Input 的富集百分比

1. 用您的引物对已知 DNA 量的 Input DNA（对于培养细胞样本，从第 B 节第 12 步；对于组织样本，从 D 节第 15 步）进行 qPCR 制作标准曲线，一个点三个平行重复。对三到五个 10 倍梯度稀释的样品（例如 0.005 ng、0.05 ng、0.5 ng、5 ng 和 50 ng）进行 qPCR。

2. 使用阳性对照引物（已知结合位点）和阴性对照引物（基因组中您感兴趣的蛋白质不结合的区域），对 ChIP 和 IgG 样本以及 Input DNA 标准的稀释样本进行 qPCR。
3. 您的 qPCR 仪将根据标准曲线为每个 qPCR 反应赋值。如果你的机器不能自动平均样本的三个平行重复，您需要手动计算这些平均值。
4. 对于每一个 qPCR 反应，您需要计算您使用的 ChIP DNA 进行 qPCR 量相对于总 ChIP DNA 的百分比。为了计算整个反应中的量，将整个 ChIP 反应的洗脱体积除以 qPCR 反应中使用的体积（例如，如果在 200 μ l 中洗脱 ChIP DNA，在 qPCR 反应中使用 5 μ l，则公式为 $200/5=40$ ）。然后，将平均 qPCR 的定量结果乘以该数字（例如，qPCR 数量单位为 $\text{ng} \times 40$ ）。
5. 要将数据表示为 Input 的百分比，将上述步骤 4 中的调整值除以用于 ChIP 反应的 DNA 量，然后乘以 100%。（例如，如果在 ChIP 反应中使用 20 μ g，则相当于 20000 ng 染色质。计算方法为步骤 4 中的调整值除以 20000 ng，然后乘以 100）。标准的 Input 富集值为 0.05% 到 1%。

J. 故障排除指南

问题	建议
在方案的哪一步可以停止？	实验可以在以下给定的步骤停止并将样品储存在合适温度下： <ol style="list-style-type: none"> 1. 甲醛交联和离心（贴壁细胞）之后，-80°C 2. 染色质打断之后，-80°C 3. DNA 纯化之后，-20°C
超声打断和离心后，染色质中可见粘性或浑浊层	根据细胞类型，离心后可见到脂质或糖原层。例如，肝组织可能有糖原层和乳状外观，而脂肪组织可能有脂质层。当你去除上清液时要避免这些层。但是，如果整个上清液浑浊，则不会干扰 IP 反应。
打断染色质得率低	使用的细胞数不足。使用更多的细胞数制备染色质。 细胞核没有释放。即使使用超声打断，也推荐使用 Dounce 均质器进行均质化。使用带有小间隙杵的 Dounce 均质器（货号 40401 和 40415）。在显微镜下监测细胞裂解情况。一般来说，裂解的细胞越多，打断的染色质产量就越高。 超声样品乳化。通过逐渐增大超声波发生器的功率来避免乳化。如果染色质制备不慎乳化，停止打断，并在 4°C 微型离心机中以 8,000 rpm 的转速离心 4 分钟，以除去滞留的空气。 配制细胞或组织固定液时使用新鲜甲醛。 缓冲液的用量和样本大小不成比例。参考手册中细胞生长的建议来放大或缩小染色质的制备。
打断效率在凝胶上无法清晰分辨	样品卡在上样槽里，从上到下都能看到弥散或条纹。打断后的染色质需要解交联，去除蛋白质（蛋白酶 K）和 RNA（RNase），然后进行 DNA 纯化。 高分子量产物。通过再次超声来减低打断片段大小。如果使用了其他的解交联方法，或者在进行琼脂糖凝胶分析之前，省略了 100°C 下在 NaCl 中孵育 20 分钟的步骤，请重复 Input 染色质制备并遵循手册说明。
进行大体积染色质的 ChIP	不推荐。最好设置几个小的 ChIP 反应（每个 $200\ \mu\text{l}$ ）并在最后归集样品，而不是尝试将单个大样本进行 ChIP。不要进行单一的放大反应，因为捕集效率较低。
在加入 3 M 醋酸钠后 ChIP DNA 没有变成亮黄色	如果颜色为浅橙色或紫色，则表明 pH 值过高。每次再加入 3 M 乙酸钠 $5\ \mu\text{l}$ ，加入后搅拌直到溶液变成亮黄色。这一步对 DNA 结合和纯化的成功至关重要。如需全彩色图像，请参阅我们网站上的 Chromatin IP DNA Purification 试剂盒（货号 58002）。
背景高	染色质打断不够。打断应产生足够小的 DNA 片段，以排除相邻染色体序列中的背景，但也有可能太大，大到可能使你的扩增产物保持完整。我们推荐 200-1500 bp 的片段。如果 DNA 片段太大，背景就会增加。考虑增加超声功率。检查凝胶上的片段大小来评估你的打断效率。 抗体问题。与 ChIP 反应中染色质数量相关的抗体过多。过量的抗体会导致更多的非特异性结合，这将被检测为背景增加。
靶向抗体的效率低或者无富集	染色质太少。一般来说，我们建议每个 ChIP 反应使用 10-30 μg 染色质。对于高丰度蛋白，如 DNA 相关靶点（组蛋白），建议使用至少 1000 个细胞或 6.7 ng

	<p>染色质；对于非常低丰度的转录因子，建议使用至少 5 万个细胞或 333 ng 的染色质。每次 IP 反应最多使用 50 µg 染色质。一定要定量分析需要进行 ChIP 实验的染色质样品的浓度，以确保每个样品都使用足够的染色质，并且每个 ChIP 中使用相同量的染色质。</p>
	<p>抗体未经 ChIP 验证。这种抗体不能有效识别固定蛋白，这是因为识别表位被固定破坏，或者是因为表位被其他蛋白质掩盖在一个更大的复合体中。为了帮助验证 ChIP 抗体，使用同一物种的阳性对照抗体（如组蛋白 H3K4me3，货号 39915）和阴性 IgG，以及已证明在 PCR 中起作用的引物。Active Motif 提供物种特异性的 ChIP-IT Control qPCR 试剂盒（货号 53026,53027,53028）来对抗体进行验证。</p>
	<p>低亲和力抗体。建议更换抗体。</p>
	<p>抗体对蛋白质 G 的亲和力较弱。单克隆抗体与蛋白质 G 具有可变的结合亲和力。蛋白质 G 是 pH 依赖的，每个 Ig 的最佳 pH 值可能会有所不同。如果单克隆抗体亲和力低，可以使用我们的桥接抗体（货号 53017）来显著提高蛋白质 G 的捕获效率。这个抗体是兔源抗小鼠多克隆抗体。它识别小鼠免疫球蛋白的所有亚类。如果你的小鼠 IgG 与蛋白质 A 或 G 有弱/中等亲和力，桥接抗体将增加珠子的抗体捕获，而不会显著增加背景。</p>
	<p>PCR 问题。确认阳性对照引物的扩增产物可与抗体结合。识别其他结合站点。</p>
ChIP DNA 没有 PCR 条带（但是 Input DNA 有条带，且在正确的位置）	<p>增加 ChIP 反应中染色质的用量，抗体的用量，或两者兼而有之。</p> <p>使用不同的抗体。</p>
实时 PCR 没有 PCR 产物	<p>确认您引物的物种特异性和效率。您可能需要重新设计引物。在终点 PCR 中起作用的引物并不总是在 qPCR 中起作用。</p> <p>DNA 纯化清洗缓冲液中不含乙醇。在第一次使用之前，请确保已将乙醇添加到 DNA 纯化清洗缓冲液中。</p>

K. 相关产品

ChIP-IT [®] 试剂盒	规格	货号
ChIP-IT [®] Express	25 次	53008
ChIP-IT [®] Express Enzymatic	25 次	53009
ChIP-IT [®] Express Shearing kit	10 次	53032
ChIP-IT [®] Express Enzymatic Shearing kit	10 次	53035
ChIP-IT [®] High Sensitivity	16 次	53040
ChIP-IT [®] qPCR Analysis kit	10 次	53029
ChIP-IT [®] ChIP-Seq	10 个文库	53041
ChIP-IT [®] FFPE	16 次	53045
ChIP-IT [®] FFPE Chromatin Preparation kit	5 次	53030
ChIP-IT [®] Express HT	96 次	53018
Re-ChIP-IT [®]	25 次	53016
RNA ChIP-IT [®]	25 次	53024
Chromatin IP DNA Purification kit	50 次	58002
EpiShear [™] 超声打断仪探头	110 V	53051
EpiShear [™] 冷却超声打断仪, 1.5 ml	1 台仪器	53080
ChIP-IT [®] Protein G Magnetic Beads	25 次	53014
Protein G Agarose Columns	30 次	53039
Siliconized Tubes, 1.7 ml	25 个离心管	53036
ChIP-IT [®] Control qPCR Kit – Human	5 次	53026
ChIP-IT [®] Control qPCR Kit – Mouse	5 次	53027
ChIP-IT [®] Control qPCR Kit – Rat	5 次	53028
ChIP-IT [®] Control Kit – Human	5 次	53010
ChIP-IT [®] Control Kit – Mouse	5 次	53011
ChIP-IT [®] Control Kit – Rat	5 次	53012
Ready-to-ChIP HeLa Chromatin	10 次	53015
Ready-to-ChIP Hep G2 Chromatin	10 次	53019
Ready-to-ChIP K562 Chromatin	10 次	53020
Ready-to-ChIP NIH/3T3 Chromatin	10 次	53021
鼠 IgG 桥接抗体	500 µg	53017
Dounce 均质器	1 ml	40401
Dounce 均质器	15 ml	40415

ChIP 验证抗体

要获取最新的 ChIP 验证抗体列表, 请访问 www.activemotif.com/chipabs 网站。

全基因组扩增	规格	货号
GenoMatrix™ Whole Genome Amplification 试剂盒	1 个试剂盒	58001

Co-Immunoprecipitation	规格	货号
Nuclear Complex Co-IP 试剂盒	50 次	54001
Universal Magnetic Co-IP 试剂盒	25 次	54002

Modified Histones Assay	规格	货号
MODified™ Histone Peptide Array	1 个芯片	13001

Histones Modification FP Binding Assay	规格	货号
HiLite™ Histone H3 Methyl-Lys9/Lys27 FP Binding Assay	1 个试剂盒	57001

Histone ELISAs	规格	货号
Histone H3 monomethyl Lys4 ELISA	1 x 96 次	53101
Histone H3 dimethyl Lys4 ELISA	1 x 96 次	53112
Histone H3 trimethyl Lys4 ELISA	1 x 96 次	53113
Histone H3 acetyl Lys9 ELISA	1 x 96 次	53114
Histone H3 dimethyl Lys9 ELISA	1 x 96 次	53108
Histone H3 trimethyl Lys9 ELISA	1 x 96 次	53109
Histone H3 monomethyl Lys27 ELISA	1 x 96 次	53104
Histone H3 trimethyl Lys27 ELISA	1 x 96 次	53106
Histone H3 phospho Ser10 ELISA	1 x 96 次	53111
Histone H3 phospho Ser28 ELISA	1 x 96 次	53100
Histone H3 acetyl Lys14 ELISA	1 x 96 次	53115

Histone Purification & Chromatin Assembly	规格	货号
Histone Purification kit	10 次	40025
Histone Purification Mini kit	10 次	40026
Chromatin Assembly kit	10 次	53500
HeLa Core Histones	36 µg	53501

重组甲基化，乙酰化，磷酸化组蛋白
 要获取最新的重组组蛋白列表，请访问 www.activemotif.com/recombhis 网站。

组蛋白乙酰化酶和去乙酰化酶活性	规格	货号
HAT Assay kit (Fluorescent)	1 x 96 次	56100
Recombinant p300 protein, catalytic domain	5 µg	31205
Recombinant GCN5 protein, active	5 µg	31204
HDAC Assay kit (Fluorescent)	1 x 96 次	56200
HDAC Assay kit (Colorimetric)	1 x 96 次	56210

Histone Demethylase Activity	规格	货号
Histone Demethylase Assay (Fluorescent)	48 次	53200

DNA Methylation	规格	货号
hMeDIP	10 次	55010
MeDIP	10 次	55009
MethylDetector™	50 次	55001
MethylCollector™	25 次	55002
MethylCollector™ Ultra	30 次	55005
UnmethylCollector™	30 次	55004
Hydroxymethyl Collector™	25 次	55013
DNMT Activity/Inhibition Assay	96 次	55006
Methylated DNA Standard 试剂盒	3 x 2.5 µg	55008
Fully Methylated Jurkat DNA	10 µg	55003
Jurkat genomic DNA	10 µg	55007