

ChIP-IT[®] Express Enzymatic
Magnetic Chromatin
Immunoprecipitation Kit
&
Enzymatic Shearing Kit

(F5 版本)

货号: 53009 & 53035

Active Motif 中国

地址: 上海市闵行区万康路 290 号

电话: (86)-21-20926090

邮箱: techchina@activemotif.com

版权所有 2021 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。

© 2014 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
方案流程.....	2
参考文献.....	2
ChIP-IT Express Enzymatic 的优点.....	3
配套产品.....	4
试剂包含组分和储藏条件.....	6
ChIP-IT Express Enzymatic (货号: 53009).....	6
ChIP-IT Express Enzymatic Shearing Kit (货号: 53035).....	7
额外所需耗材.....	8
可选耗材.....	8
ChIP-IT Express Enzymatic 实验设计.....	9
实验方案-染色质的制备.....	11
A. 细胞固定和剪切.....	11
实验方案-染色质免疫沉淀.....	14
B. 免疫沉淀.....	14
C. 磁珠的清洗.....	15
D. 染色质的洗脱, 解交联及 Proteinase K 处理.....	15
实验方案-PCR 分析.....	17
E. 终点 PCR.....	17
F. 实时定量 PCR.....	20
附录.....	24
Section A 细胞固定以优化剪切条件.....	24
Section B 酶切条件优化.....	25
Section C DNA 清洗以评估剪切效率和 DNA 浓度.....	26
Section D 不同细胞起始量的染色质制备.....	28
Section E 磁珠和磁力条的使用.....	29
Section F 故障指南.....	32
Section G 相关产品.....	36

概述

ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) 是研究蛋白与 DNA 互作的有力工具^[1,2]。利用甲醛固定完整的细胞, 能够交联和保护蛋白与 DNA 的互作。随后将 DNA 剪切成小片段, 可以用超声或者酶切的方法将 DNA 剪切成大小相对一致的片段, 通过抗体免疫感兴趣的蛋白与 DNA 互作复合体。紧接着解交联, 利用蛋白酶 K (Proteinase K) 去除蛋白质, 回收目标 DNA 片段。对回收的 DNA 进行分析便可知蛋白结合怎样的 DNA 序列 (见第二页的图一)。

ChIP 在染色质生物学和转录调控领域是非常有用的一种实验方法, 用于确认染色质蛋白, 甲基化修饰, 和转录因子的特异作用位点。而且, 蛋白质与 DNA 相互作用是在内源性染色体环境中固定的, 所以 ChIP 结果反映了染色体拓扑结构(Topology)的影响和细胞调节蛋白的作用^[3,4,5]。

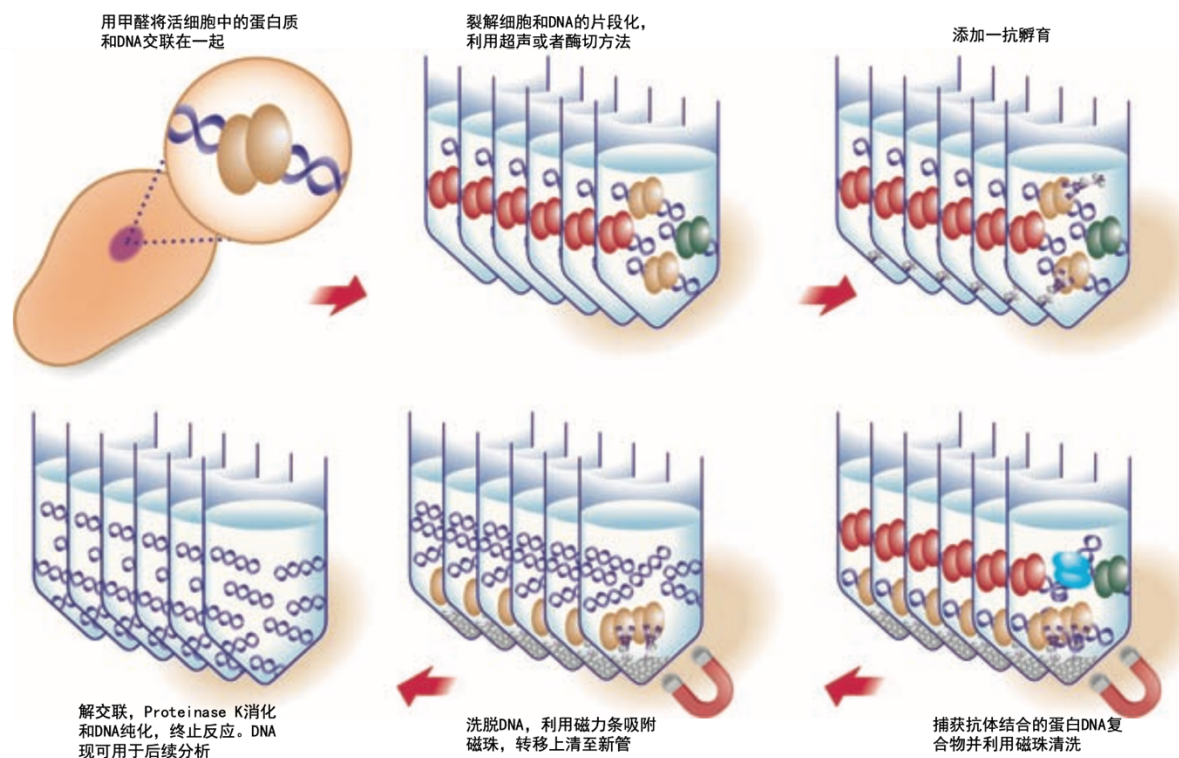
ChIP 技术的实验要求较高, 需要高质量的抗体去识别固定后的目标蛋白, 同时还需要高效的试剂 (通常指 protein A or G beads) 沉积抗体和染色质的复合物。除此之外, 还需要特定化学试剂, 抑制剂, 和封闭液, 从而减少非特异性富集以及蛋白的降解。

Active Motif's ChIP-IT[®]Express Enzymatic Kits 提供完全的 ChIP 实验方案, 更加便捷, 准确的监测蛋白与 DNA 的互作。ChIP-IT[®]Express Enzymatic Kits 利用 protein G 耦合磁珠, 充分简化了实验方法和提高了 ChIP 实验的效率。相比于经典的 ChIP 实验方法, 很多步骤在此试剂盒中被简化或完全舍弃 (详见第三页), 使得 ChIP-IT Express 成为一个快速, 高效的 ChIP 实验方案。

ChIP-IT[®]Express Enzymatic Kits 所包含试剂可供 10 个样本染色质的准备, 也有用于 2 种剪切优化, 总共能提供 25 次 ChIP 反应。如果您需要剪切更多的染色质, 可单独加购 ChIP-IT Express Shearing Kit。另外, 若想了解更多实验文档或 ChIP-IT Express 系列相关产品的信息, 请访问 www.activemotif.com/chipitdocs。

产品名称	规格	货号
ChIP-IT [®] Express Enzymatic	25 rxns	53009
ChIP-IT [®] Express Enzymatic Shearing Kit	10 rxns	53035
ChIP-IT [®] Protein G Magnetic Beads	25 rxns	53014

方案流程



图一 ChIP-IT Express 实验方案的流程图

在 ChIP-IT Express 实验过程中, 用甲醛固定细胞中蛋白与 DNA 的复合物, 被固定后的 DNA 经超声剪切或者酶切消化成短片段。片段化后的染色质与一抗经孵育后, 抗体结合目标蛋白与 DNA 的复合物。再经 Protein G 磁珠的偶联。最后经清洗和解交联步骤, 回收纯化后的 DNA 片段用于后续 ChIP 结果分析。

参考文献

1. Solomon, M.J. *et al.* (1988) *Cell* 53(6):937-47.
2. Solomon, M.J. and Varshavsky A. (1985) *PNAS USA* 82(19):6470-4.
3. Kuo, M.H. and Allis, C.D. (1999) *Methods* 19(3):425-33.
4. Weinman, A.S. and Farnham, P.J. (2002) *Methods* 26:37-47.
5. Caretti, G. *et al.* (2003) *J Biological Chem.* 278:30435-30440.

ChIP-IT Express Enzymatic 的优点

完备的试剂供快速高效的 ChIP 实验

- 更短的实验步骤，和显著减少的操作时间。
- 同时进行多个样本的 ChIP 实验。
- 兼容多通道加样。

ChIP-IT Express 和 ChIP-IT Express Enzymatic 两款试剂盒全方位的简化了染色质免疫共沉淀步骤。试剂盒可用于染色质的制备，最佳染色质剪切条件的确定和 ChIP 实验。

ChIP-IT Express Enzymatic 试剂盒中包含的组分足够 10 个样本染色质的制备，适用于两种不同方式的染色质剪切，且能够满足 25 个样本的 ChIP 实验。试剂盒中还包含了 Protein G 包被的磁珠供实验者使用，Protein G 磁珠对 IgG 具有较高的亲和性，且具有较低的非特异性结合。相比于凝胶微珠，Protein G 只需很少的清洗步骤，而且不需要预处理染色质。除此之外，磁珠的使用不需要离心步骤，只需用磁力架吸附，所需时间更短，操作更加简便，也使得操作更有利于在不扰动磁珠的情况下吸出液体，清洗步骤也可以使用排枪提高实验效率。这样的实验方案显著的减少了操作时间，且保证了样品间的统一性。在清洗步骤使用 1.7 ml 的硅化管能有效减少 Protein G 磁珠和 DNA 的损耗。

此试剂盒也对其他一些 ChIP 实验步骤进行了优化。专用的洗脱缓冲液（Elution Buffer）与解交联缓冲液（Reverse Cross-linking Buffer）相结合，可节省时间并消除操作过程中可能发生的 DNA 损失。

这些优化大大的减少了操作时间，使得 8，16，或 24 样本的 ChIP 实验可同时进行，这是传统 ChIP 实验不可能达到的。为了更高通量的 ChIP 实验，Active motif 还开发出 ChIP-IT Express HT（货号：53018），能够处理 96 个样本的 ChIP 试剂盒。

剪切的选择 — ChIP-IT Express(超声法)和 ChIP-IT Express Enzymatic（酶切法）

ChIP-IT Express 试剂盒的试剂足够准备 10 个染色质超声样本，适用于两种优化剪切方法。使用此方案，每份剪切染色质的制备都需要一个 15 cm 的细胞培养板，并且产生的染色质足以进行多达 6 个 ChIP-IT Express 反应（一个 ChIP 反应是指一样本的染色质样品与一种抗体的孵育）。但是，染色

质制备方案可以按比例放大或缩小，具体取决于所使用的细胞数（具体操作见附录-Section D）。如若需要超声制备更多的染色质样品，我司提供相应的配套试剂盒 ChIP-IT Express Shearing Kit（货号：53032）

ChIP-IT Express Enzymatic Kit 与 ChIP-IT Express Kit 类似，但它是使用拥有专利的剪切酶（Enzymatic Shearing Cocktail）和消化缓冲液（Digestion Buffer）替代超声的方式剪切染色质。因为酶切法过程仅于时间和温度有关，所以不会有超声过程的过度和乳化问题的出现。因此酶切法不仅更简单，而且还可以更轻松地优化剪切条件并在制备之间进行更可重复的剪切，从而改善了 ChIP 的结果。

配套产品

请访问我们的网站以获取有关以下各项的完整信息，这些产品和其他相关产品的货号在本手册附录部分中列出：

由于合适的对照能使 ChIP 的结果和故障排除更加容易分析，因此 Active Motif 提供了用于人类，小鼠和大鼠样品的 **ChIP-IT Control Kit**。这些有用的试剂盒包含阳性和阴性对照抗体以及物种特异性的阳性对照 PCR 引物。用于验证 ChIP 级抗体时，此试剂盒是非常有用的。

经过验证的 **ChIP Control qPCR primer sets** 也可以单独用作阳性对照和阴性对照，用于许多常见的 ChIP 靶点，以验证 ChIP 反应是否成功。使用我们的引物将节省合成和测试您自己的基因/物种特异性对照引物所需的时间和精力。

Active motif 生产的 **Ready-to-ChIP Chromatin** 是从多种不同细胞系（HeLa, Hep G2, K-562 和 NIH/3T3）中提取的高质量染色质，且已用超声片段化，可直接用于 ChIP 反应。

对于需要制作比 **ChIP-IT Express Kit** 提供的试剂更多的剪切染色质样品的用户，可单独购买 **ChIP-IT Express Shearing Kits**。

如果您使用的小鼠单克隆抗体的同种型不能与 Protein G 很好地结合，请考虑使用我们的小鼠 IgG 桥接抗体（**Bridging Antibody for Mouse IgG**）。它与 Protein G 磁珠和小鼠一抗都具有很强的亲和力。这样可以最大程度地捕获小鼠抗体-免疫复合物，从而改善使用小鼠一抗的 ChIP 和 IP 实验的结果。

最后，ChIP 的一个困难方面是找到能够与目标蛋白，结合并通过甲醛固定 DNA 的识别目标蛋白的抗体。在蛋白质印迹（Western Blot）或其他应用中表现良好的抗体在 ChIP 实验中可能无法很好地发挥作用。因此，Active Motif 提供了数量不断增加的经过 ChIP 验证的抗体，这些抗体已被验证可在 ChIP 中使用。请参阅本手册的附录- Section G，或访问 www.activemotif.com/chipabs 查看最新的 ChIP 级抗体列表。

Active Motif 的 **ChIP-IT High Sensitivity Kit** 非常适合在研究低丰度转录因子，与结合亲和力不佳的抗体一起使用或在细胞数量有限的情况下开展 ChIP 实验时使用。该实验方案提供更高的灵敏度来克服这些障碍。ChIP-IT High Sensitivity Kit 与 ChIP-IT qPCR Anylysis Kit 兼容，可用于简化 qPCR 分析并实现多种样品类型和实验数据的标准化。

ChIP-IT Express HT 专为需要执行许多 ChIP 的用户而设计。通过为您提供基于磁珠的 ChIP-IT Express Kit 方法改善为可实现 96 孔 ChIP 实验的试剂和方法，它可以实现真正的高通量 ChIP。

一个共同的实验目标是确定在单个染色质样品的同一基因座上存在两个表观遗传标记或染色质相关蛋白。这是通过连续的 ChIP 完成的，在该过程中，将样品用另一种抗体进行第二次 ChIP 处理。由于序列染色质免疫沉淀反应（Sequential ChIP）可能是一个复杂的过程，因此 Active Motif 提供 **Re-ChIP-IT Kit**，该试剂是针对 ChIP-IT-Express 开发的方法，简化了的序列染色质免疫沉淀反应（Sequential ChIP）技术。

对于希望将 ChIP 结合 NGS（ChIP-Seq）进行全基因组分析的研究人员，Active Motif 提供了 **ChIP-IT ChIP-Seq** 分析试剂盒。该试剂盒包括经过验证的试剂，简化的实验方案和对照，以进行 ChIP 富集，验证 ChIP 反应并准备用于 NGS 文库构建。

经典的 ChIP 实验是使用甲醛固定的组织或培养的细胞系进行的。为了利用可从临床样本中获得有价值的回顾性数据，Active Motif 开发了 **ChIP-IT FFPE Kit**，可与福尔马林固定的石蜡包埋（FFPE）组织块和组织学切片一起使用。

试剂包含组分和储藏条件

ChIP-IT Express Enzymatic (货号: 53009)

请依据下表对试剂盒中各组分进行合理保存。**Protein G** 收货后不可再复冻 (re-freeze)。

试剂名称	容量	储存条件/稳定性
RNase A (10 µg/µl)	40 µl	-20°C 6 个月
5 M NaCl	200 µl	-20°C 6 个月
100 mM PMSF	475 µl	-20°C 6 个月
Proteinase K (0.5 µg/µl)	250 µl	-20°C 6 个月
Protein K Stop Solution	150 µl	-20°C 6 个月
Protease inhibitor Cocktail (PIC)	2 × 100 µl	-20°C 6 个月
1 × Lysis Buffer	16 ml	-20°C 6 个月
10 × Glycine	33 ml	-20°C 6 个月
10 × PBS	120 ml	-20°C 6 个月
Elution Buffer AM2	1.6 ml	-20°C 6 个月
Reverse Cross-linking Buffer	1.6 ml	-20°C 6 个月
ChIP Buffer1	70 ml	-20°C 6 个月
ChIP Buffer2	70 ml	-20°C 6 个月
Digestion Buffer	11 ml	-20°C 6 个月
Enzymatic Shearing Cocktail	6 µl	-20°C 6 个月
0.5 M EDTA	280 µl	-20°C 6 个月
Protein G Magnetic Beads*	650 µl	4°C 6 个月
Siliconized 1.7 ml microcentrifuge tube	25	室温
Bar Magnet	1	室温
Mini Glue Dots	1 sheet	室温

*Protein G 磁珠不可反复冻融。当收到试剂盒后, 请将磁珠 4°C 保存。

ChIP-IT Express Enzymatic Shearing Kit (货号: 53035)

此表为 ChIP-IT Express Enzymatic Shearing Kit 的组分列表, 只包含剪切相关试剂。完整的 ChIP-IT Enzymatic Kit 的组分列表见前页。请依据下表信息保存各试剂组分。

试剂名称	容量	储存条件/稳定性
RNase A (10 µg/µl)	40 µl	-20°C 6 个月
5 M NaCl	200 µl	-20°C 6 个月
100 mM PMSF	475 µl	-20°C 6 个月
Proteinase K (0.5 µg/µl)	250 µl	-20°C 6 个月
Protein K Stop Solution	150 µl	-20°C 6 个月
Protease inhibitor Cocktail (PIC)	2 × 100µl	-20°C 6 个月
1 × Lysis Buffer	16 ml	-20°C 6 个月
10 × Glycine	33 ml	-20°C 6 个月
10 × PBS	120 ml	-20°C 6 个月
Digestion Buffer	11 ml	-20°C 6 个月
Enzymatic Shearing Cocktail	6 µl	-20°C 6 个月
0.5 M EDTA	280 µl	-20°C 6 个月

额外所需耗材

- 靶标蛋白的 ChIP 级抗体
- 带有小间隙研杵的 Dounce 均质器（例如：货号 40401 和 40415 带有紧密配合的研磨杵）。酶切需要使用均质器，强烈建议通过超声波剪切染色质。Dounce 均质化极大地提高 ChIP 实验的成功机会
- 磁力架。可使用配套的磁力条（详见附录一 Section E）或者购买商业化磁力架（例如：Promega MagneSphere® 12 孔磁力架）
- 37% 甲醛溶液（福尔马林）含 10-15% 的甲醇以防止多聚反应，不建议使用多聚甲醛
- 相差显微镜或组织培养显微镜，加血球计数板
- 50% 甘油（去离子水配制）
- 酚/氯仿（1：1）TE 饱和 pH=8.0（DNA 纯化，分子生物学级）
- 3 M 乙酸钠 pH=5.2（在通过分光光度法或凝胶电泳检查浓度之前，纯化的 input DNA 或者纯化剪切后的 DNA 检测）
- 100% 乙醇
- 70% 乙醇
- DNase-free H₂O（纯化 input DNA）
- 培养板的旋转台
- 置于 4°C 的旋转摇床（例如 Barnstead/ThermoLyne 公司的 Labquake，带有 1.7 ml 微型离心管的管座）
- 离心机（台式 4°C 离心机）和离心管
- DNA 定量分光光度计
- 移液器和枪头（建议使用带滤芯的枪头）
- 琼脂糖凝胶电泳仪
- 细胞培养基（无血清培养板）
- 细胞刮刀（橡皮淀帚）

可选耗材

- 八连管（例如：Thermo Fisher 货号：AB-0451）
- 1.7 ml 硅化管（例如：Active Motif 货号：53036）
- Chromatin IP DNA Purification 试剂盒（例如：Active motif 货号：58002）

ChIP-IT Express Enzymatic 实验设计

在实验开始以前请完整阅读实验说明书

要点诀窍

- 细胞培养和染色质的制备

当计划一个实验时，请计算您将需要准备的染色质数量，并确定您计划对每个准备的染色质进行的 ChIP 的数量。一定要在计算时将对照 ChIP 实验也包含进去。此外，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）细胞制备染色质作为参考样品。

- Protein G 包被的磁珠

提供的磁珠一旦完全再悬浮形成均匀的泥浆，就可以使用了。不需要再封闭磁珠和预清洗样本。为了最好的实验结果，轻柔的混匀试管。磁珠沉降速度较快，在使用前可用移液枪吹打重悬。**Protein G 磁珠请勿反复冻融，直接放于 4°C 保存。**ChIP-IT 的 Protein G 磁珠可单独购买（货号：53014）。

- 需使用 ChIP 级抗体

ChIP 抗体必须能够识别与 DNA 结合和/或其他蛋白质复合的固定的天然蛋白质。许多抗体在其他实验中有较好的效果，但不一定适用于 ChIP 实验。因此，使用未经验证的 ChIP 抗体必须使用对照抗体（例如 Active Motif 的 RNA pol II 抗体，货号：39097）和阴性对照抗体 IgG（小鼠 IgG 对应小鼠单克隆，兔 IgG 对应兔的多克隆）验证染色质制备和 ChIP 方法。为方便起见，Active Motif 提供用于人类、小鼠和大鼠样本的 ChIP-IT Control Kit，这些试剂盒包含阳性和阴性对照抗体、合适的阳性 PCR 引物、PCR 缓冲液和上样染料。（详见附录）。

- 硅化管

使用试剂盒中提供的 1.7 ml 硅化管，或八连管进行 ChIP 实验（制备染色质和分离 input DNA 若使用此管，会使得 ChIP 实验试管用量受限，请勿在染色质制备和 input DNA 分离步骤使用此管）。

- 磁力条

提供的磁力条可用于 1.7 ml 硅化管或八连管（见附录-Section E）。或使用商业侧拉式磁力架（例如：Promega MagneSphere[®] 12 位磁力架-1.7 ml 离心管型）。



- **完全重悬溶液**

室温下完全融解 PMSF 和 Proteinase K Stop Solution，大概需要 30 分钟。在使用前轻柔涡旋震荡并瞬时离心。

- **抗体的用量**

最佳结果通常用 1-3 μg 抗体。然而，这将根据抗体的亲和力和染色质的质量而变化，您可能需要使用更多的特定抗体。

- **安全措施**

福尔马林和 PMSF 是剧毒化学品。使用时请佩戴合适的安全装备（例如：安全眼镜，手套，实验服）。同时，福尔马林具有吸入毒性，请在通风橱中使用。如果染色质是从生物危害性或传染性物质中提取的，则应在生物安全罩中进行染色质超声处理。

实验方案-染色质的制备

A. 细胞固定和剪切

此方案适用于 15 cm 培养皿（约 1.5×10^7 个细胞）的固定及染色质的酶切片段化（附录-Section D 包含其他量级细胞的实验方案）。请在使用本方案前确定您所用样本的剪切条件。若未确定，请不要直接使用本方案。请依据附录中的 Section A 确定您所用样本的酶切条件。根据确定后的酶切条件，使用本方案（见下文）。

剪切小要点：

酶切最关键的方面是细胞的高效解离，使酶能够进入染色质。我们建议使用具有小间隙杵的 dounce 均质器，在不破坏核的情况下机械剪切质膜。利用显微镜观测细胞裂解情况是非常有用的。如果细胞难以破碎，即使是使用了 dounce 均质器，可将固定时间降低到 5 min。重要的是，在细胞充分裂解之前不要添加酶混合物（Enzymatic Cocktail）。

剪切酶混合物中的酶是随机切割酶（与序列无关）。然而，这些酶更偏向于切割染色质的开放区域，例如两个核小体之间的区域。因此，消化产生了特定大小的产物 DNA 片段：~150bp（一个核小体），~300bp（两个核小体），~450bp（三个核小体），以此类推，随着分子量的增加，条带的强度随之下降。这是一个很好的方法用于染色质的剪切，只需极少的额外步骤检查细胞的裂解情况在加入酶之前。一旦优化了细胞类型的裂解条件和剪切时间，每次都可以得到一致的结果。

ChIP-IT Enzymatic 也非常适用于下游需要小片段的应用（如:ChIP-Seq）。测序平台需要小片段 DNA（100-200 bp），因此我们建议使用酶切，它比超声更容易产生更小的片段。利用酶切法制备如此小的片段需要更长的反应时间（可能需要 15-30 分钟）。通过超声波处理，碎片的大小可能会受到限制在稍大的片段，这主要取决于所使用的设备。

注：下文实验方法中部分缓冲液需要加入 PMSF 和蛋白酶抑制剂（Protease inhibitors, PIC）。融化这些缓冲液在实验开始之前（例如提前 30 min 室温融化），在实验使用前加入 PMSF 和蛋白酶抑制剂。

1. 在一个 15 cm 培养皿中培养 70-80%的细胞。可以对细胞中感兴趣的通路进行刺激。
2. 当细胞准备好收获时，新鲜制备以下溶液。下面的体积适用于一个 15 cm 培养皿：
 - a. **固定液：**取 0.54 ml 37% 甲醛溶液与 20 ml 基础细胞培养基混匀，室温放置。
 - b. **1×PBS 溶液：**取 2.33 ml 10×PBS 溶液与 21 ml dH₂O 混合均匀，冰上放置。

- c. **甘氨酸终止液:** 1 ml 10×甘氨酸溶液 (10×Glycine Buffer), 1 ml 10×PBS 和 8 ml dH₂O 混合均匀, 室温放置。
- d. **细胞刮除液:** 0.6 ml 10×PBS 与 5.4 ml dH₂O 混匀, 冰上放置。
- 将培养基从细胞中倒出, 在每个平板上加入 20 ml 固定液。室温下, 在摇床上孵育 10 min。
注: 在标准方案中, 染色质在剪切前固定 10 min。虽然这是标准的固定条件, 但一些抗体/染色质组合可能在较短的固定时间内工作得更好。
 - 将固定液小心倾倒掉, 并在每个平板上加入 10 ml 预冷的 1× PBS 清洗。摇晃盘子 5 s, 然后倒出 PBS。
 - 在每个平板中加入 10 ml 甘氨酸终止液以终止固定反应, 覆盖整个平板, 室温摇晃反应 5 min。
 - 将终止液倒掉后, 加入 10 ml 预冷的 1×PBS, 水平晃动平板 5 s, 倒掉 PBS 溶液。
 - 细胞刮除液使用前加入 30 μl 100 mM PMSF。每个平板加入 5 ml 预冷的细胞刮除液, 用细胞刮刀刮取细胞。以一定角度握住培养板, 向下刮取细胞, 将其收集在培养板的底部边缘。用 1 ml 移液管将细胞转移到冰上的 15 ml 锥形管中。
 - 第 7 步刮取的细胞 4°C 2,500 rpm (720 RCF) 离心 10 min。
 - 去除上清, 完成后可继续后续步骤, 也可冻存细胞聚团物。若是冻存处理, 加入 1 μl 100mM PMSF 和 1 μl PIC 后 -80°C 保存。

酶切法制备染色质片段

下面的章节描述了用酶切法分离和制备染色质。

- 冰上解冻冻存的固定后细胞聚团, 同时用 1 ml 预冷的 Lysis Buffer (含 5 μl PIC + 5 μl PMSF), 轻柔吹打并短暂涡旋以重悬细胞。冰上孵育 30 min。

在此期配制酶切混合物 (Enzymatic Shearing Cocktail) 的工作液 (200 U/ml)。将酶切混合物 (2×10⁴ U/ml) 按 1 : 100 比例稀释于 dH₂O 溶解的 50% 甘油中。200 U/ml 的工作液将被用于第 5 步, 可 4°C 稳定保存 1-2 周。

试剂名称	1-2 rxns	3-5 rxns	6-10 rxns
Enzymatic Shearing Cocktail (2×10 ⁴ U/ml)	0.5 μl	1 μl	2 μl
50% 甘油	49.5 μl	99 μl	198 μl

- 将细胞转移到一个预冷的 dounce 均质器中。在冰上搅拌 10 下, 以利于细胞核释放。

细胞裂解状态检测：为确保细胞完全裂解，取 10 μ l 在相差显微镜下用血球计数板观察，以确认细胞核已被释放。在裂解步骤前后观察细胞状态通常是有帮助的，因为这样更容易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。在裂解后的细胞中，细胞核将呈现圆点状，周围环绕着不对称的碎片。如果细胞没有溶解，则在冰上再用 dounce 研磨杵研磨 10 下，或直到细胞充分裂解。

3. 转移匀浆至 1.7 ml 离心管中，4 $^{\circ}$ C 5,000 rpm (2,400 RCF) 离心 10 min。
4. 小心移除上清。加入 350 μ l Digestion Buffer(需加入 1.75 μ l PIC 和 1.75 μ l PMSF), 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min。
5. 预热的细胞核悬液中加入 17 μ l Enzymatic Shearing Cocktail 工作液 (200 U/ml)，涡旋混匀。
6. 在 37 $^{\circ}$ C 下进行酶切反应，反应时间依据您确定的最适合您的细胞系的时间(之前依据附录—Section A-C 确定)。每两分钟涡旋混匀一次从而提高酶切效率。
7. 每管加入 7 μ l 预冷的 0.5 M EDTA 终止反应，冰上放置 10 min。
8. 4 $^{\circ}$ C 15,000 rpm (18,000 RCF) 离心 10 min。小心转移上清至新的 1.7 ml 离心管中，此溶液包含了剪切后的染色质。剪切后的染色质可立即使用，也可-80 $^{\circ}$ C 保存。在冻存前，取出 50 μ l 用于评估剪切效率和 DNA 浓度。剩余的染色质 (约 350 μ l) 足够 6 个 ChIP 反应的开展，为了减少融冻次数，在冻存前请分装。

注：根据附录—Section C 部分的 DNA 清洗方案处理上述 50 μ l 染色质样本，以检查 DNA 浓度并确认染色质已被剪切。您需要 DNA 的浓度用于后续 ChIP 实验。

实验方案-染色质免疫沉淀

B. 免疫沉淀

1. 冰上溶解染色质。取 10 μl 转移至新管中，标记为“input DNA”，input DNA 将被用于 D 中的第 6 步作为对照用于 PCR 分析。若在 6 小时内就需要使用此样本，可放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ ，否则存放于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
2. 依据下表（表一），在 1.7 ml 硅化管（或者 PCR 管中）中配制 ChIP 反应体系。务必依据剪切后的 DNA 浓度计算 ChIP 反应体系。在使用磁珠前，需充分涡旋震荡（或颠倒）混匀磁珠。**抗体需最后加入反应体系。**

表一

试剂名称	1 次 ChIP 反应	1 次 ChIP 反应
	（所用染色质体积小于 60 μl ）	（所用染色质体积大于 60 μl ）
Protein G Magnetic Beads	25 μl	25 μl
ChIP buffer 1	10 μl	20 μl
片段化的染色质 (7-25 μg) *	20-60 μl	61-150 μl
Protease Inhibitor Cocktail(PIC)	1 μl	2 μl
dH ₂ O	补齐至 100 μl	补齐至 200 μl
Antibody (最后加入)	1-3 μg	1-3 μg
总体积	100 μl	200 μl

*注：根据应用的不同，ChIP 反应所用染色质的范围可在 1-50 μg 。

3. 闭合管盖，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 旋转摇床上孵育 4 h，在某些情况下，如果过夜孵育，灵敏度可能会提高。
4. 轻柔的瞬时离心收集管盖上的液体。
5. 将离心管转移至磁力架上，使磁珠汇聚在管壁处。
6. 待磁珠吸附完全后，小心吸除上清。

C. 磁珠的清洗

注：切勿使磁珠“过干燥”。从移除缓冲液到添加下一次清洗液或洗脱缓冲液之间的间隔不超过 1 分钟。关于洗珠方法的建议，详见附录一Section E。

1.7 ml 离心管的清洗方案：

1. 加入 800 μ l ChIP Buffer1，清洗一次。
2. 加入 800 μ l ChIP Buffer2，清洗两次。
3. 最后一次洗涤后，在不干扰珠子的情况下，尽可能多地去除上清液。可使用 200 μ l 的移液器用于移除上清液体。

8 连管的清洗方案：

1. 加入 200 μ l ChIP Buffer1，清洗三次。
2. 加入 200 μ l ChIP Buffer2，清洗两次。最后一次洗涤后，在不干扰珠子的情况下，尽可能多地去除上清液。

D. 染色质的洗脱，解交联及 Proteinase K 处理

1. 用 50 μ l Elution Buffer AM2 重悬清洗过的磁珠。
2. 旋转摇床上室温孵育 15 min。
3. 瞬时离心收集管盖上的液体。
4. 加入 50 μ l 解交联缓冲液（Reverse Cross-linking Buffer）并用移液器上下吹打混匀。将离心管置于磁力架上使磁珠聚集在离心管的一侧。
5. 转移上清至新管，此溶液包含染色质。
6. 现在需要使用前面准备的“input DNA”，取 10 μ l 分装 input DNA（源自 B 中第 1 步）并在冰上融化，加入 88 μ l ChIP Buffer2 和 2 μ l 5 M NaCl 与 input DNA 混合均匀，最后总体积是 100 μ l。
7. 在温度循环仪上，95 $^{\circ}$ C 同时孵育 ChIP 和 input DNA 样品 15 min。

注：如果您使用的是更大、更厚壁的微型离心管，请执行以下操作：65 $^{\circ}$ C 孵育 2.5 小时。更多的蛋白质样品可能需要更长的解交联时间。在此节点样品可储存在-20 $^{\circ}$ C。

8. 将管转至室温，如果瓶盖内部聚集了液体，则瞬时离心，然后添加 2 μ l Proteinase K。
9. 关闭管盖，混匀液体并在 37 $^{\circ}$ C 下反应 1 h。在此期间，可将 Proteinase K Stop Solution 放置室温融化 30 min 至 1 h。

10. 反应 1 h 过后，将离心管转移至室温，加入 2 μ l Proteinase K Stop Solution。瞬时离心收集管盖上的液体。此时 DNA 可立即用于后续 PCR 分析，或-20 $^{\circ}$ C 保存。

实验方案-PCR 分析

E. 终点 PCR

下文的实验方案是 ChIP 收集的 DNA 的 PCR 分析指南。为了获得不同 ChIP 反应中收集的 DNA 量的可靠比较，终点 PCR (End Point PCR) 必须在线性扩增阶段停止。由于样本和 PCR 引物集合之间的扩增窗口不同，必须根据经验确定正确的 PCR 周期数。实时 PCR 分析简化了这些考虑，因为可以确定每个样本的 Ct 值，代表线性扩增开始的循环数。由于这些优点，我们建议您尽可能使用实时 PCR。

四个 DNA 模板需要经 PCR 分析：阳性抗体和阴性抗体 ChIP 实验的 DNA（例如 Active Motif 的 ChIP-IT Control Kits 中的 RNA pol II 阳性对照抗体和 IgG 阴性对照抗体），Input DNA 和实验组 ChIP 的 DNA。只用超纯水作为对照，以确保 PCR 试剂不受污染。

引物的设计

使用 silico PCR 程序（例如：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，以确保所选择的引物将从被扩增的物种的基因组 DNA 中产生单个扩增子。理想情况下，扩增子长度应为 150-400 bp 用于标准 PCR。PCR 设计软件的使用有助于选择好的引物对。

注：PCR 非常灵敏，应采取一切预防措施防止污染。应戴手套并使用带滤芯的移液管。

PCR 程序的设置

在下面的例子中，PCR 反应是使用 2 种不同的 PCR 体系建立的，其中包含阳性和阴性对照 PCR 引物集合。如果您使用的是来自 Active Motif ChIP-IT Control 试剂盒的中的阳性对照抗体，则可能只有阳性对照 PCR 引物可使用，因为我们选择阳性对照抗体是因为它们与基因组中的许多区域结合，这使得为我们的阳性对照抗体设计“阴性对照”引物不切实际。对于用其他抗体进行的 ChIP 分析，根据抗体的不同，可能包括适用于该抗体的阳性和阴性 PCR 引物集合。

1. PCR 循环程序，94°C 预变性 3 min，然后 30-36 个循环如下步骤 [94°C 20 s, 59°C 30 s, 72°C 30 s]，最后 10°C 保持。每个 PCR 反应的总体积是 25 µl。最好从 36 个循环开始，可能需要根据实际情况优化循环数。
2. **重要：**依据 1 : 10 稀释 input DNA，取 20 µl input DNA 与 180 µl dH₂O 混匀。
3. 使用下表对 PCR 管进行标记，并添加 PCR 模板和仅水的对照，使试管保持在冰上。然后添加步骤 4 中要用的 PCR 扩增反应混合物：

反应编号	PCR 模板 (每个 5 μ l)	PCR 反应物 (每个 20 μ l)
1	ChIP DNA — 阳性对照抗体	阳性引物 PCR 反应
2	ChIP DNA — 阴性对照抗体 IgG	阳性引物 PCR 反应
3	Input DNA (稀释比 1:10)	阳性引物 PCR 反应
4	ChIP DNA — 靶标抗体	阳性引物 PCR 反应
5	H ₂ O (不含有 DNA)	阳性引物 PCR 反应
6	ChIP DNA — 阳性对照抗体	阴性引物 PCR 反应
7	ChIP DNA — 阴性对照抗体 (IgG)	阴性引物 PCR 反应
8	Input DNA (稀释比 1:10)	阴性引物 PCR 反应
9	ChIP DNA — 靶标抗体	阴性引物 PCR 反应
10	H ₂ O (不含有 DNA)	阴性引物 PCR 反应

4. 依据下表，冰上配制阳性和阴性对照 PCR 扩增反应混合物。先加入 dH₂O 最后加入 *Taq* 聚合酶。混合均匀后冰上放置。这可确保反应混合物在循环开始前处于非活性状态。正如上文中所提及的，Active Motif 的 ChIP-IT Control 试剂盒质包含阳性对照 PCR 引物以及阳性抗体和阴性抗体 IgG（引物是以混合物的形式提供的，其中包含了正向和反向引物，所以每个反应只需 4 μ l）。然而，对于您的靶标抗体我们建议设计对应的阳性和阴性引物集合，并在实验前测试其引物可用性。

阳性引物 PCR 反应体系

试剂名称	1 个反应	5 个反应
DEPC H ₂ O	12.3 μ l	61.5 μ l
阳性正向引物 (5 pmol/ μ l)	2.0 μ l	10 μ l
阳性反向引物 (5 pmol/ μ l)	2.0 μ l	10 μ l
dNTP mixture (5 mM each dNTP)	1.0 μ l	5.0 μ l
10 \times PCR Buffer	2.5 μ l	12.5 μ l
<i>Taq</i> (5 U/ μ l)	0.2 μ l	1.0 μ l
总体积 (不包含 DNA 模板)	20 μ l	100 μ l

阴性引物 PCR 反应体系：

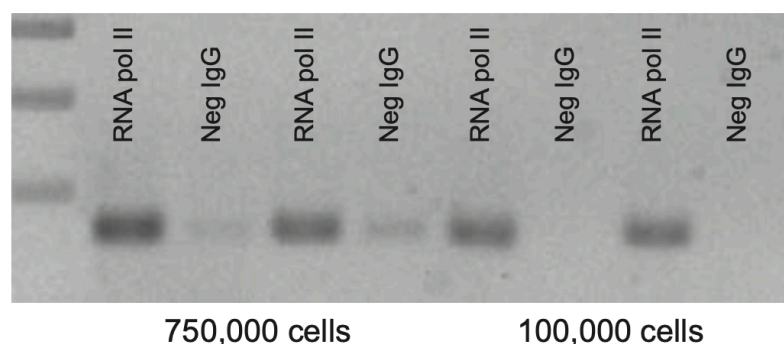
试剂名称	1 个反应	5 个反应
DEPC H ₂ O	12.3 μ l	61.5 μ l
阴性正向引物 (5 pmol/ μ l)	2.0 μ l	10 μ l
阴性反向引物 (5 pmol/ μ l)	2.0 μ l	10 μ l
dNTP mixture (5 mM each dNTP)	1.0 μ l	5.0 μ l
10 \times PCR Buffer	2.5 μ l	12.5 μ l
<i>Taq</i> (5 U/ μ l)	0.2 μ l	1.0 μ l
总体积 (不包含 DNA 模板)	20 μ l	100 μ l

- 将第 4 步配好的 20 μ l PCR 反应混合物中加入第 3 步 5 μ l PCR DNA 模板，总体积 25 μ l，冰上吹打混匀。小心盖好 PCR 管盖并确保每管的反应物都在管底。
- 将 PCR 管转移至按第 1 步设好程序的 PCR 仪中。待反应完成后，转移样品至冰上。
- 此时可将样本立即用于后续分析，也可-20 $^{\circ}$ C冻存。

PCR 产物分析

- 取~8 μ l PCR 产物用于 3% 琼脂糖凝胶检测。剩余产物保存以备不时之需。
- 用人 GAPDH 阳性对照引物扩增产物 166 bp；小鼠 EF1a 引物扩增的引物为 233 bp，而大鼠肌动蛋白引物产生 223 bp 的 PCR 产物。使用 50 或 100 bp 的 DNA ladder 作为迁移标准。凝胶电泳直到 PCR 产物与引物和引物二聚体分离良好。染色凝胶并分析。

GAPDH Primers



图二 应用 ChIP-IT Express 对 100000 个细胞进行染色质免疫沉淀 PCR

HeLa 细胞用 1%甲醛固定 10min，超声剪切（5 次脉冲）制备染色质。使用阴性对照 IgG 和 RNA pol II 抗体对从 100,000 和 750,000 个细胞分离的染色质进行 ChIP 检测。用 GAPDH 阳性对照引物对 ChIP 反应分离的 DNA 进行 36 个 PCR 循环的分析(这些抗体和引物来源于 ChIP-IT Control Kit-Human，小鼠和大鼠也有对应试剂盒，详见参见相关产品)。10 μ l PCR 产物用于 1%琼脂糖凝胶检测，并在溴化乙锭染色后通过紫外线照射进行观察。用 GAPDH 引物对 RNA pol II 抗体分离的 DNA 进行 PCR，比用阴性对照 IgG 分离的 DNA 进行的类似反应产生更多的产物。这些结果表明，用 RNA pol II 抗体构建的 ChIP 能显著富集 GAPDH 启动子 DNA，而用阴性 IgG 构建的 ChIP 不能富集 GAPDH 启动子 DNA。

F. 实时定量 PCR

在免疫沉淀染色质的最终洗脱、解交联和 Proteinase K 消化之后，在某些下游应用之前，样品应经过 DNA 清理步骤。对于实时 PCR，我们建议在扩增前使用 Active Motif 的 Chromatin IP DNA 纯化试剂盒（货号：58002）。这些柱子的产量为 50 μ l，每次 PCR 会用到 2 μ l，足够 25 个 PCR 反应的 DNA。我们建议您使用市售 SYBR Green PCR 试剂盒和实时定量检测 PCR 仪。

A. 引物的设计

- 用 silico PCR 程序（例如：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。终点 PCR 设计的引物可能并不适用于实时定量 PCR。
- 应避免使用会产生二聚体的引物，因为它们将被 SYBR Green 结合，这将影响准确定量。你可以测试你的引物的自我互补性和二级结构在 http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi。
- 理想情况下，扩增子长度应为 50-150 bp，用于实时 PCR。
- 应避免 3' 末端的 G/C 延伸。
- 正向和反向引物之间的 Tm 值差异不应超过 3°C。

B. 建立标准曲线确定富集倍数

注：这一步不是必需的，但许多下游计算将依赖于标准曲线。

1. 为了测试引物的效率，请使用引物组对已知 DNA 量的 input DNA 进行 qPCR，生成标准曲线，一式三份。运行 10 倍稀释的三到五个样品，例如：0.005 ng、0.05 ng、0.5 ng、5 ng 和 50 ng。
2. 运行 ChIP 和 IgG 组样品以及 input DNA 标准的稀释队列。每个引物组都有不同的扩增曲线，因此可以绘制 Ct 值以创建线性回归图。这可能不是必需的，因为大多数实时热循环仪会自动创建标准曲线。
3. Ct = Threshold Cycle (信号超过背景阈值水平的循环数)

4. Plot Ct vs DNA quantity (log scale) 生成的标准曲线图 (图三)。

使用标准曲线斜率计算倍数富集的两种方法。对于大多数情况，第一种方法已足够，但也提供了可选的第二种方法。

Method 1:

1. 第一种方法需要 (a) 求解 ChIP 和 IgG 样本的 DNA 量，然后 (b) 计算 ChIP 样本相对于 IgG 样本的富集倍数：

$$X = \text{DNA 量}$$

$$Y = \text{Ct}$$

$$M = \text{标准曲线的斜率}$$

$$B = \text{当 } X = 1 \text{ 时对应的 Ct 值, (例如图三所示: Ct} = 27.46)$$

$$\text{ChIP Ct} = 22.77 \text{ 循环 (来自图三)}$$

$$\text{IgG Ct} = 30.22 \text{ 循环 (来自图三)}$$

$$(a) Y = M(\log X) + B \text{ 或者}$$

$$\log(X) = (Y - B) \div M$$

$$(b) \text{富集倍数} = \text{ChIP DNA 的量} \div \text{IgG DNA 的量}$$

利用图三中的数据，计算过程如下：

使用已知的斜率、y 截距、ChIP Ct 和 IgG Ct 的值求解 X：

$$(a) \log(X) = (Y - B) \div M$$

$$\text{如: } \log(\text{DNA 总量}) = (\text{Ct} - \text{y-int}) \div \text{斜率}$$

$$\text{ChIP 样本: } \log(X) = (22.77 - 27.463) \div -3.508 \text{ 即 } X = 21.767 \text{ ng}$$

$$\text{IgG 样本: } \log(X) = (30.22 - 27.463) \div -3.508 \text{ 即 } X = 0.1637 \text{ ng}$$

- (b) 用计算出的 DNA 量计算富集倍数：

$$21.767 \text{ ng} \div 0.1637 \text{ ng} = 133 \text{ 倍}$$

Method 2:

2. 第二种方法将富集度计算为 ChIP 样品的扩增效率与 IgG 的扩增效率之比。

引物的效率可依据标准曲线斜率和下列公式计算得出：

$$\% \text{效率} = [10^{(-1/\text{斜率})} - 1] \times 100\%$$

如图三所示，斜率 = -3.508

$$\% \text{效率} = [10^{(-1/\text{斜率})} - 1] \times 100\% = [10^{(-1/-3.508)} - 1] \times 100\%$$

$$\% \text{效率} = [1.928 - 1] \times 100\% = 0.928 \times 100\%$$

$$\% \text{效率} = 92.8\%$$

最理想的效率应该在 $100 \pm 10\%$ （范围：90-110%，当斜率 = -3.32 时，效率 = 100%）。在这个案例中，引物的效率在理想效率范围内。所以，此引物的扩增效率可以用来计算 ChIP 和 IgG 样本的扩增效率。

$$AE = \text{扩增效率（是引物效率的一个系数）} = 10^{(-1/\text{斜率})}$$

$$Fd = \text{稀释系数（例如：1）}$$

$$(a) \quad \%ChIP = AE^{(\text{input Ct} - \text{ChIP Ct})} \times (Fd) (100)$$

$$(b) \quad \%IgG = AE^{(\text{input Ct} - \text{IgG Ct})} \times (Fd) (100)$$

$$(c) \quad \text{富集倍数} = \%ChIP \div \%IgG$$

运用图三中的数据，计算如下：

$$\text{斜率} = -3.508$$

$$AE = 10^{(-1/\text{斜率})} = 10^{(-1/-3.508)} = 1.928$$

Input Ct = 21.36 循环（选取最接近 ChIP 样品的 input DNA 值，即图三上 input DNA = 50ng）

ChIP Ct = 22.77 循环（图三）

IgG Ct = 30.22 循环（图三）

$$(a) \quad \%ChIP = (1.928^{(21.36 - 22.77)}) (1) (100)$$

$$\%ChIP = (1.928^{(-1.41)}) (1) (100)$$

$$\%ChIP = 39.62\%$$

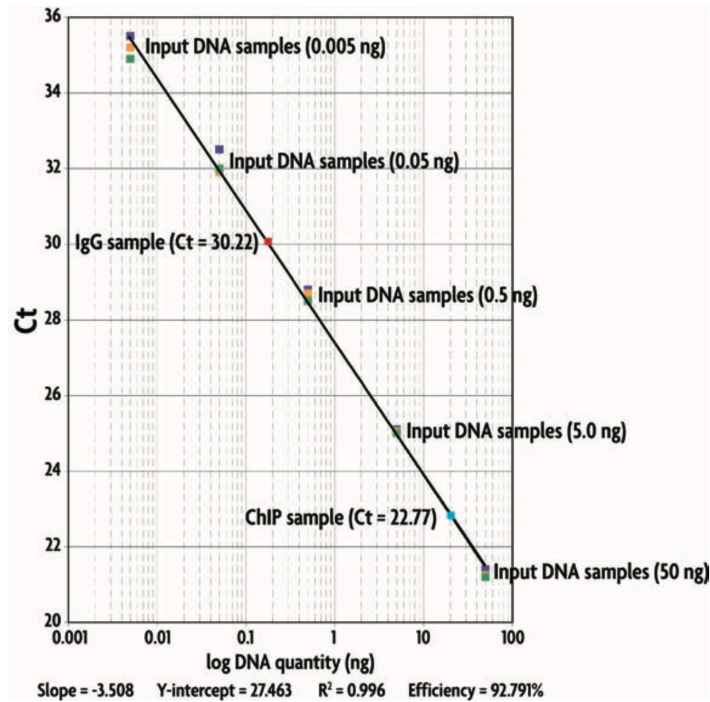
$$(b) \quad \%IgG = (1.928^{(21.36 - 30.22)}) (1) (100)$$

$$\%IgG = (1.928^{(-8.86)}) (1) (100)$$

$$\%IgG = 0.3\%$$

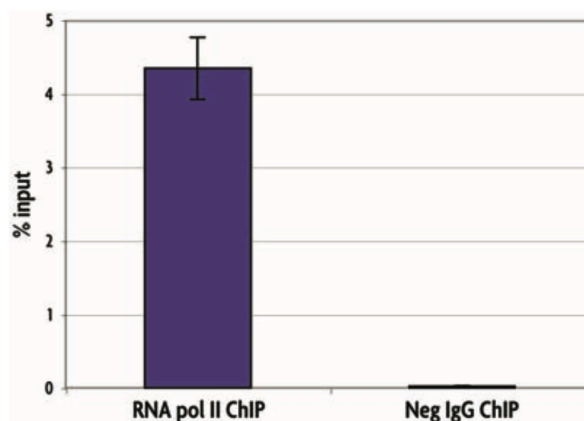
(c) 最终富集倍数的计算如下：

$$39.62\% \div 0.3\% = 132 \text{ 倍}$$



图三 按 10 倍比例稀释的 input DNA 标准曲线

用 GAPDH 引物将 5 份 10 倍稀释的 input DNA，ChIP 和 IgG 样品一起进行 qPCR 扩增，每个样品共扩增 3 份。绘制每个 input DNA 量的 Ct 值，并用于产生标准曲线。其斜率和 y 截距值与样品的 Ct 值一起计算富集度。



图四 利用 GAPDH 启动子 DNA 检测 RNA pol II 抗体与阴性抗体 IgG 的 ChIP 富集度

HeLa 细胞用 1%甲醛固定 10min，超声剪切（5 次脉冲）制备染色质。ChIP 是用从 750,000 个细胞分离的染色质使用 ChIP-IT Express 试剂盒，使用阴性对照 IgG 和阳性对照 RNA pol II 抗体（货号：39097）。用 GAPDH 基因特异性引物对从每个 ChIP 反应中纯化的 DNA 进行实时 PCR(这些抗体和引物集可在 ChIP IT Control Kit-Human（货号：53010）中同时获得。这些结果表明，用 RNA pol II 抗体构建的 ChIP 能显著富集 GAPDH 启动子 DNA，而用阴性 IgG 构建的 ChIP 不能富集 GAPDH 启动子 DNA。

附录

染色质剪切条件的优化

染色质剪切条件可能因细胞类型而显著不同，有时还取决于细胞培养和细胞刺激条件。然而，在为给定的细胞类型优化剪切后，这些条件通常保持恒定在该细胞类型。因此，当您第一次从细胞系中提取染色质时，我们建议使用以下方案来确定最佳剪切条件。然后您可以使用优化的条件从这个细胞类型和刺激条件下制备染色质

Section A 细胞固定以优化剪切条件

在开始之前请阅读实验设计。虽然染色质制备~350 μ l，但只有 200 μ l 用于剪切效率分析。如果按照指示将 PIC 和 PMSF 包括在固定和消化缓冲液中，则未使用的~150 μ l 染色质的可以冷冻保存，当确定最佳剪切条件后，此冻存染色质可以解冻，根据最佳条件剪切，然后用于 ChIP 实验。然而，在优化过程中使用 PIC 和 PMSF 将减少剪切和 ChIP 反应的数量，使您一旦您建立了最佳剪切条件并准备好进行正式实验时试剂可能出现不够的情况。

注意：如果您想在 ChIP 实验中使用未使用过的染色质，在开始此方案前解冻 PIC 和 PMSF，并在使用前立即添加到缓冲液中。在剪切分析时冻存未使用的染色质。如果执行优化只是为了识别剪切参数，请不要将 PIC 和 PMSF 添加到缓冲液。这将节省这些试剂，以便您可以使用它们来准备额外的样品剪切染色质使用您的条件优化，并执行额外的 ChIP 反应。

1. 在一个 15 cm 培养皿中培养 70-80%的细胞。可以对细胞中感兴趣的通路进行刺激。
2. 当细胞准备好收获时，新鲜制备以下溶液。下面的体积适用于一个 15 cm 培养皿（约 1.5×10^7 cells）：
 - a. **固定液：**取 0.54 ml 37% 甲醛溶液与 20 ml 基础细胞培养基混匀，室温放置。
 - b. **1×PBS 溶液：**取 2.33 ml 10×PBS 溶液与 21 ml dH₂O 混合均匀，冰上放置。
 - c. **甘氨酸终止液：**1 ml 10×甘氨酸溶液，1 ml 10×PBS 和 8 ml dH₂O 混合均匀，室温放置。
 - d. **细胞刮除液：**0.6 ml 10×PBS 与 5.4 ml dH₂O 混匀，冰上放置。

3. 将培养基从细胞中倒出，在每个平板上加入 20 ml 固定液。室温下在摇床上孵育 10 min。

注：在标准方案中，染色质在剪切前固定 10 min。虽然这些标准的固定条件，但一些抗体/染色质组合可能在较短的固定时间内工作得更好。

4. 将固定液倒掉，并在每个平板上加入 10 ml 预冷的 1× PBS 清洗。摇晃盘子 5 s，然后倒出 PBS。
5. 在每个平板中加入 10 ml 甘氨酸终止液以终止固定反应，覆盖整个平板，室温摇晃反应 5 min。

6. 将终止液倒掉后，加入 10 ml 预冷的 1×PBS，水平晃动平板 5 s，倒掉 PBS 溶液。
7. 细胞刮除液使用前加入 30 μl PMSF。每个平板加入 5 ml 预冷的细胞刮除液，用细胞刮刀刮取细胞。以一定角度握住培养板，向下刮取细胞，将其收集在培养板的底部边缘。用 1 ml 移液管将细胞转移到冰上的 15 ml 锥形管中。
8. 第 7 步刮取的细胞 4°C 2,500 rpm (720 RCF) 离心 10 min。
9. 去除上清，完成后可继续后续步骤，也可冻存细胞聚团物。若是冻存处理，加入 1 μl PMSF 和 1 μl PIC 后 -80°C 保存。

Section B 酶切条件优化

在开始前请阅读第 11 页的剪切小要点。注意，虽然 ~350 μl 染色质被制备，但只有 200 μl 用于剪切效率分析。

1. 冰上解冻 冻存的固定后细胞聚团，同时用 1 ml 预冷的 Lysis Buffer (含 5 μl PIC + 5 μl PMSF)，轻柔吹打并短暂涡旋以重悬细胞。冰上孵育 30 min。

在此期配制酶切混合物 (Enzymatic Shearing Cocktail) 的工作液 (200 U/ml)。将酶切混合物 (2×10^4 U/ml) 按 1 : 100 比例稀释于 dH₂O 溶解的 50% 甘油中。200 U/ml 的工作液将被用于第 5 步，可 4°C 稳定保存 1-2 周。

试剂名称	5 rxns
Enzymatic Shearing Cocktail (2×10^4 U/ml)	0.5 μl
50% 甘油	49.5 μl

2. 将细胞转移到一个预冷的 dounce 均质器中。在冰上搅拌 10 下，以利于细胞核释放。

细胞裂解状态检测：为确保细胞完全裂解，取 10 μl 在相差显微镜下用血球计数板观察，以确认细胞核已被释放。在裂解步骤前后观察细胞状态通常是有帮助的，因为这样更容易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。在裂解后的细胞中，细胞核将呈现圆点状，周围环绕着不对称的碎片。如果细胞没有完全裂解，则在冰上再用 dounce 研磨杵研磨 10 下，或直到细胞充分裂解。

3. 转移匀浆至 1.7 ml 离心管中，4°C 5,000 rpm (2,400 RCF) 离心 10 min。
4. 小心移除上清。加入 350 μl Digestion Buffer (需加入 1.75 μl PIC 和 1.75 μl PMSF)，37°C 孵育 5 min。

5. 准备 4 个新的离心管，每管加入 50 μl Digestion Buffer 重悬的样本，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 min。剩余的 ~ 150 μl 样本 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。（当确定了最佳酶切条件后，冻存的样本可加入 7.5 μl 酶进行第 6 步的酶切。）
6. 为了利用酶消化优化剪切条件，设置如下所示的 4 个反应。在较低的设定值上涡流管以混合成分。在培养过程中，大约每 2 min 对试管进行一次涡流，以提高剪切效率。
 - a. 50 μl 染色质加 2.5 μl dH₂O（不含酶） — 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min
 - b. 50 μl 染色质加 2.5 μl 酶切混合物 — 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min
 - c. 50 μl 染色质加 2.5 μl 酶切混合物 — 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min
 - d. 50 μl 染色质加 2.5 μl 酶切混合物 — 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min
7. 每管加入 1 μl 冷的 0.5 M EDTA 溶液终止反应。冰上放置 10 min。
8. 4 $^{\circ}\text{C}$ 15,000 rpm（18,000 RCF）离心酶切后的样本 10 min。收集上清，酶切后的样本可 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存，或者进行 Section C 中的解交联和纯化过程用于凝胶电泳分析。

Section C DNA 清洗以评估剪切效率和 DNA 浓度

1. 若需要，融解分装的 50 μl 剪切后的染色质样本。
2. 每管加入 150 μl dH₂O 后加入 10 μl 5 M NaCl。
3. 在 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅或者热循环仪上孵育样本 4 h 或过夜解交联。使用水浴锅时请防止样品管管盖因加热而弹开。
4. 每管样品加入 1 μl RNase A 并 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min。
5. 每管加入 10 μl Proteinase K 并 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h。

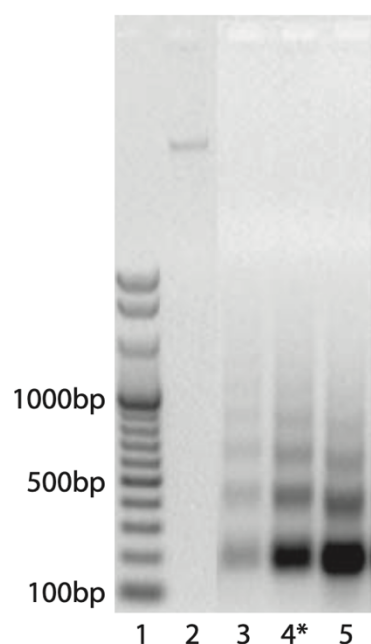
注：如果您打算用分光光度计来测定 DNA 的浓度，必须先把 DNA 清理干净。不建议柱纯化，因为高蛋白含量可能会堵塞柱。因此，DNA 应该用苯酚/氯仿提取和沉淀，步骤如下：

- a. 每个样品加入 200 μl 苯酚/氯仿（1 : 1） TE 饱和，pH = 8。涡旋震荡混匀后用台式离心机最高速离心 5 min。
- b. 转移水相至新管，加入 20 μl 3 M 醋酸钠（pH=5.2）和 500 μl 100% 乙醇。涡旋混匀后，-80 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h，或者 -20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜放置。
- c. 利用台式离心机最大转速 4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 10 min。
- d. 小心移除上清，切勿触碰底部沉淀。
- e. 加入 500 μl 70% 预冷乙醇（不可扰动沉淀），最大转速离心 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min。
- f. 小心移除上清，切勿扰动底部沉淀，空干。

g. 空干后，加入 30 μ l dH₂O 重悬沉淀，并用分光光度计检测 260 nm 下吸光度，确定 DNA 浓度（1.0 A₂₆₀ 单位 = 50 μ g/ml）。

小份 DNA 的浓度可以用来反算被剪切染色质样品的浓度。可选，但建议：如果您对多个染色质样本（如未处理和处理的样本）进行 ChIP 检测，请计算初始 DNA 浓度，以便所有 ChIP 反应的初始 DNA 量相等（建议使用 7-25 μ g）。这确保了每个 IP 使用等量的染色质，使得处理组之间的相对差异具有可比性。

- 我们建议在凝胶上加载两个不同量的剪切后样品，以确保其中一个在可接受的范围内。添加 4 μ l 6 \times Loading Buffer 与 16 μ l 样品混合。然后再 1% TAE 琼脂糖凝胶中每个样品分别上样 5 μ l 和 10 μ l。100 V 电泳 45 min 至 1 h，直到上样染料移动至胶的下 3/4 位时停止电泳。
- 最佳的酶切结果应如图五的第 4 泳道所示，片段大小在 200-1500 bp 左右。
- 如果在优化实验中使用 PIC 和 PMSF，则剩余的~150 μ l 在上述步骤 B5 中冷冻的染色质，可按最佳条件剪切。酶切体系可按 Section B 中的第 6 步按比例计算。例如，~150 μ l 未酶切的染色质需要 7.5 μ l 酶切混合物。按最优时间 37 $^{\circ}$ C 孵育。用 3 μ l 冷的 0.5 M EDTA 终止反应。在冰上放置 10 min。以 15,000 rpm（18,000 RCF）的转速将样品在台式微型离心机中 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min。收集上清，剪切后的染色质可以储存在-80 $^{\circ}$ C 一年，或立即用于 ChIP 反应。



图五 酶切效果电泳分析（ChIP-IT Express Enzymatic）

HeLa 细胞用 1% 甲醛固定 10 min，然后用 ChIP-IT Express 酶试剂盒制备染色质。用酶切混合物

（Enzymatic Shearing Cocktail）酶切染色质 5、10 和 15 min，加入冷 EDTA 停止反应。剪切和未剪切的染色质样品进行解交联，用蛋白酶 K 处理，苯酚/氯仿提取并沉淀，如方案所述。样品通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分离。最佳剪切染色质将产生 200-1,500 bp 的条带。

泳道 1：100 至 1,000 bp 的 Ladder

泳道 2：未剪切的 HeLa DNA

泳道 3：HeLa DNA 经 5 min 剪切

泳道 4：HeLa DNA 经 10 min 剪切（最优剪切结果）

泳道 5：HeLa DNA 经 15 min 剪切

*注：在此实验中，DNA 酶切 10 min 是最优结果，并在后续 ChIP 实验中取得良好结果。

Section D 不同细胞起始量的染色质制备

我们的标准染色质制备方案使用细胞生长在一个 15 cm 的组织培养板（约 1.5×10^7 cells），并产生足够的材料来完成多达 6 个 ChIP 反应。根据您的实验，您可能希望使用不同体积的细胞。下面的信息和表格旨在帮助我们调整方案以使用不同的细胞数量。

- 不建议使用小于 500 μ l 或 2 ml 以上裂解缓冲液，用于细胞裂解和 Dounce 均质化步骤。
- 如果您打算比较不同样本的 ChIP 结果，请保证样本间处理的一致性。例如，将诱导细胞和未诱导细胞生长在相同大小的培养板中，并达到相同的密度，然后使用相同的体积和剪切条件。这将有助于确保染色质试剂在细胞数量（基因组等量）、DNA 剪切效率等方面是等效的。量化制备的染色质中的 DNA 的总量（通过遵循上述 DNA 清洗协议），然后在每个 ChIP 分析中使用等量的染色质。
- 每个人类二倍体细胞含有 6.6 pg 的 DNA。如果已知起始材料中的细胞数，这可以用来估计染色质制备中的 DNA。我们估计染色质剪切的 DNA 回收率约为 60-70%，这取决于细胞/组织类型。

	1 个孔 (24 孔板)	10 cm 培养皿	15 cm 培养皿	3×15 cm 培养皿
细胞数量	130,000	0.66×10^7	1.5×10^7	4.5×10^7
(组织重量)	(-)	(-)	(~75 mg)	(~225 mg)
固定液	2 ml	10 ml	20 ml	60 ml (20 ml/plate)
甘氨酸终止液	1 ml	5 ml	10 ml	30 ml (10 ml/plate)
1 × PBS	2 × 1 ml	2 × 5 ml	2 × 10 ml	2 × 30 ml (2 × 10 ml/plate)
细胞刮除液 + PMSF	500 μ l + 2.5 μ l PMSF	1 ml + 5 μ l PMSF	5 ml + 30 μ l PMSF	15 ml + 90 μ l PMSF (5 ml + 30 μ l/plate)
Lysis Buffer + PIC + PMSF	200 μ l + 1 μ l PIC + 1 μ l PMSF	500 μ l + 2.5 μ l PIC + 2.5 μ l PMSF	1 ml + 5 μ l PIC + 5 μ l PMSF	3 ml + 15 μ l PIC + 15 μ l PMSF
Digestion Buffer + PIC + PMSF	50 μ l + 0.25 μ l PIC + 0.25 μ l PMSF	175 μ l + 0.875 μ l PIC + 0.875 μ l PMSF	350 μ l + 1.75 μ l PIC + 1.75 μ l PMSF	1000 μ l + 5 μ l PIC + 5 μ l PMSF
Enzymatic Shearing Cocktail, 稀释后	2.5 μ l	8 μ l	17 μ l	50 μ l
0.5 M EDTA	1 μ l	3.5 μ l	7 μ l	20 μ l

Section E 磁珠和磁力条的使用

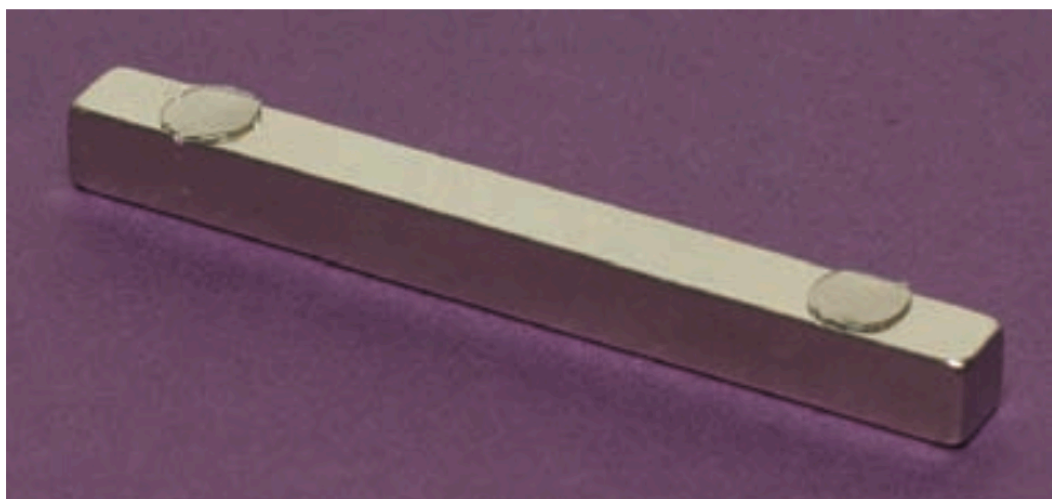
- 磁铁应存放在提供的管中。
- 在金属物体或表面附近工作时要小心。一块磁铁会以惊人的速度跳到附近的金属表面上很远的距离。这会破坏磁铁。
- 使用提供的微型胶点将条形磁铁连接到空的枪头盒上，以构建一个临时的磁性支架，用于 PCR 管或微量离心管。
- 如果磁铁附着在平坦的金属表面上，则应将其从表面边缘滑出，将其移除。如果你试图将磁铁的一端从金属上拉开或撬开，磁铁可能会断开。

注：钕棒磁铁是非常强大的，如果处理不当，很容易被破坏。

制作一个适用于八连管的磁力架

注：建议 8 连管选用适配标准 96 孔 PCR 仪的耗材（例如：Thermo Fisher AB-0451）

1. 将一条 PCR 管放在一个空的针头盒（200 μ l 的枪头盒）并将磁铁直接靠在管子上。磁铁将被定位，胶点是用来粘贴到盒子上。
2. 从两个胶点的一侧取下覆盖的胶带，将胶点贴在条形磁铁上（胶点的未覆盖面放在朝上），如下所示。

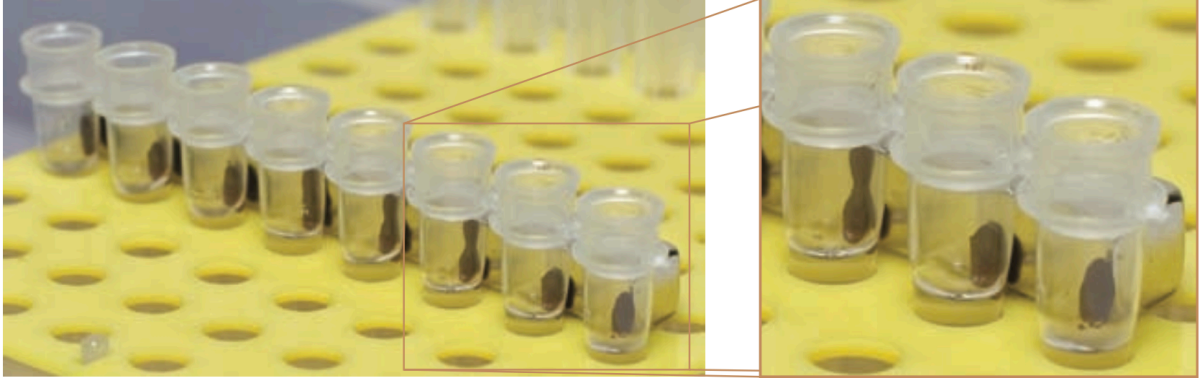


3. 从胶点的外露侧撕下覆盖胶带。将磁铁固定到枪头盒上，使其紧靠 PCR 管。磁性支架现在可以使用了。

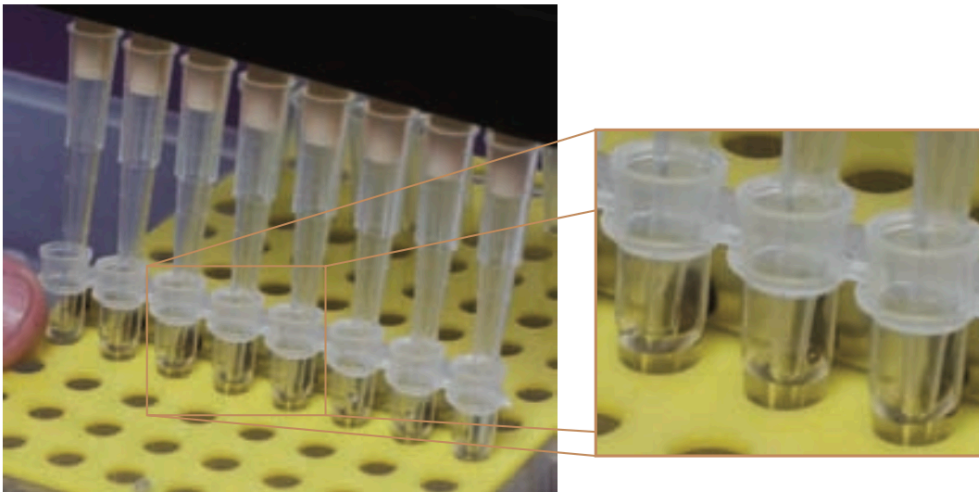
注：在首次使用 PCR 管之前，请熟悉使用磁性支架。在 8 连管中的一个管中加 5 μ l 磁珠和 100 μ l ChIP Buffer1。使用组装的磁铁支架，熟悉磁珠和磁铁的使用。如果管直接与磁铁相邻，则很难重新悬浮磁珠，因此最好将管从磁铁上移开，以便进行重悬步骤。

清洗步骤如下：

- a. 将管子靠着磁铁放在支架上，让珠子固定在管子的侧面，如下所示。



- b. 用 200 μ l 移液枪或 200 μ l 的排枪移除上清。



- c. 将 8 连管移动到与磁铁不相邻的一排。
- d. 加入洗涤缓冲液，用移液枪上下吹打，使珠子完全重新悬浮。重新悬浮完成后，确保尽量少的磁珠被。
- e. 重复步骤 a-d 直到所需的清洗步骤完成。

八连管的离心：

当使用 8 连带管时，可能需要对管进行离心，以收集瓶盖内部的液体和珠子。这是可以很容易做到，使用离心机装有的平板离心适配器。在适配器中放置一个标准的 96 孔板，以便将管固定到位。确保平衡转子（即在转子相对的 96 孔板适配器中放置一个适当质量的 96 孔板）。短暂离心，使转子达到 $1000 \times g$ 的速度，然后让转子停止。

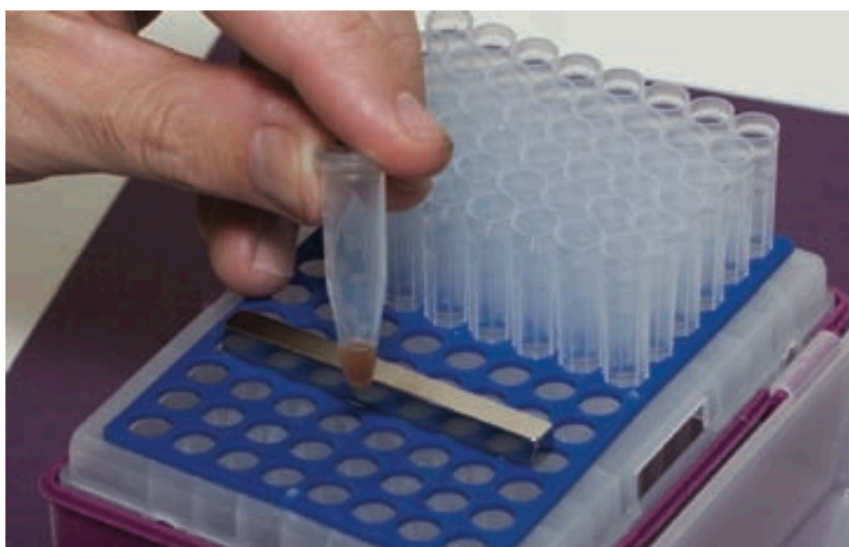
制作一个适用于 1.7 ml 离心管的磁力架

1. 从两个胶点的一侧取下覆盖胶带。
2. 将两个 1.7 ml 离心管放置在一个空的枪盒中（1000 μ l 的枪盒）把磁铁直接放在管子上。使磁铁被定位，用胶点将磁条粘贴到盒子上。
3. 如上文所示，将胶点贴在条形磁铁上（胶点的未覆盖面朝上）。
4. 从胶点的外露侧撕下覆盖胶带。将磁铁固定在枪盒上，使其紧靠管子。磁性支架现在可以使用了。

注：1.7 ml 微型离心管在这种组装管架中的固定比在典型的商用磁力支架中的固定更不牢固。请严格按照以下清洗方案。一次操作一个管子，将管子放在标准管架上，不要把管子直接放在磁铁旁边。

单管清洗步骤如下（最好一次只操作一管）：

1. 将试管放入标准的 1.7 ml 微型离心试管架中，并打开盖子。
2. 将打开的管放入组装好的磁性支架中。如下图所示，将管底部靠在磁铁上，然后缓慢地放入孔中，珠子将更快地形成聚集。这会使珠子在管子的侧面上形成小球。



3. 使珠子完全成团，并用 1000 μ l 移液枪去除上清。您可以将管留在机架中，也可以在去除缓冲液后将其拔出。珠子将留在管的一侧，即使不在磁铁旁边。
4. 将试管放回标准离心管架上，加 800 μ l 清洗缓冲液，并通过上下吹打将珠子完全重新悬浮。
5. 重复步骤 2-4，直到完成所需的清洗步骤。最后一次清洗完成后，清除清洗缓冲液应该用 200 μ l 的移液枪。

Section F 故障指南

故障/问题	建议
哪些步骤节点可以中途停止？	<p>以下步骤节点可停止，样本可在一定温度下保存一段时间：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 固定完成并离心后，-80℃保存 2. 染色质剪切后，-80℃保存 3. 解交联后，-20℃保存 4. DNA 清洗后，-20℃保存
染色质剪切后产量较少。	<p>细胞核未完全释放。使用酶切法制备片段化染色质的时候，dounce 均质化处理非常重要（也非常建议在超声法时使用）。使用带有小间隙杵的 Dounce 均质器（见第 7 页可选材料中的参考资料）。按照方案所述，在显微镜下检测细胞裂解。一般来说，被裂解的细胞越多，被剪切的染色质产量就越高。</p> <p>减少固定时间，过固定细胞常常使得细胞裂解和染色质剪切效果不好。长时间的交联往往会导致细胞形成一个巨大的交联聚集体，不能有效地剪切。将甲醛固定步骤的培养时间减少到 5 分钟。</p> <p>配制固定液的时候使用新的福尔马林溶液。</p> <p>缓冲液未按样本大小成比例配制。使用附录 D 部分中的图表放大或缩小染色质制备体系。</p>
凝胶分析发现剪切效率不高。	<p>样品卡在孔中，能从胶带上发现拖带或者污迹和条纹。剪断的染色质需要解交联，去除蛋白质（蛋白酶 K）和 RNA（核糖核酸酶），然后用苯酚/氯仿纯化 DNA。遵循附录 C 部分的 DNA 清理方案。不建议使用 DNA 纯化柱，因为高蛋白含量可能会堵塞柱。</p> <p>对于含有大量染色质的样品，可能需要较长时间（65℃孵育 4 小时或过夜）解交联。</p> <p>在纯化过程中丢失了 DNA。苯酚应该用 pH 值为 8 的 TE 溶液的饱和溶液。较低的 pH 值溶液会降解 DNA。由于样品蛋白质含量高，不建议柱纯化，这可能会堵塞柱。</p> <p>高分子量产品。你必须用更长的消化时间重复染色质的制备。在消化过程中，确保每 2 分钟旋转一次样品。</p>

故障/问题	建议
电泳检测条带并未呈现梯度 (ladder-like) 样式	单一的~100-200 bp 的条带出现在凝胶上，且随着酶切时间的改变其不发生变化。这通常表明细胞没有完全裂解，因此酶无法获得染色质。按照 dounce 样品均质化实验步骤处理样本，单纯的增加消化时间不能解决这个问题。
	没有 DNA，这对于未消化的 DNA 通道是正常的。DNA 是存在的，但是在如此大的范围内，它在凝胶上是不可见的，表明此消化样本的样本量太少（没有足够的染色质用于凝胶检测），或者 DNA 在纯化过程中丢失。
	低分子量带。消化时间过长或 Enzymatic Shearing Cocktail 稀释不当。
	胶孔附近有亮带和污染。解交联不完全。蛋白质和 DNA 仍然是交联的，不能在凝胶中正确迁移，导致大部分 DNA 卡在上样孔中，或是因为 DNA 纯化过程中丢失。
	凝胶底部有大量条带，核糖核酸酶并未将 RNA 去除干净。
	没有特定的条带，但是随着消化时间的延长，条带的大小会减小。这表明 DNA 已经降解。更快地处理样本（尤其是组织），确保按照指示放在冰上，并添加适当的蛋白酶抑制剂。
细胞裂解不充分	一些细胞类型对酶处理和酶切方法不敏感，建议使用超声处理。
预设 ChIP 实验体积超过说明书规定	不建议更改 ChIP 反应体积。最好设置几个小的 ChIP 反应（200 μ l）并在最后汇集样本，而不是试图切割一个大样本。不要进行单一的放大反应，因为捕获效率会降低。
靶标抗体富集效果差	染色质太少。通常，我们建议使用 7-10 μ g 染色质的一个“常规”ChIP（高度丰富，DNA 相关的目标，如组蛋白）。对于中等丰度的转录因子，建议使用 7-25 μ g 染色质，对于非常低丰度的转录因子，每个 ChIP 反应最多使用 50 μ g。对于小规模 ChIP 实验，染色质数量据报道低至 1 μ g，但这在很大程度上取决于转录因子的丰度和抗体的亲和力，可能需要进行相应的调整。一定要测定剪切的染色质样品的浓度，以确保每个样品使用足够的染色质，并且每个 ChIP 使用相同质量的染色质。
	抗体不是经验证的 ChIP 级的抗体。抗体不能有效识别固定的蛋白质，这可能是由于表位被固定所破坏，也可能是因为表位被更大复合物中的其他蛋白质所掩盖。为了帮助 ChIP 验证抗体，使用阳性对照

	<p>抗体（例如来自同一物种的 RNA Pol II 和阴性 IgG）以及已被证明在所使用的 PCR 类型中起作用的引物是非常关键的。</p>
	<p>低亲和性。将 ChIP 孵育时间增长，4°C 过夜旋转孵育。</p>
	<p>抗体对 Protein G 的亲合力较弱。单个单克隆对 Protein G 具有可变的结合亲和力，这种亲和力依赖于 pH 值；每种免疫球蛋白的最适 pH 值可能都不同，对于抗体亲和力低到中等的单克隆，通过使用我们的桥接抗体（货号：53017）可以显著提高 Protein G 的捕获效率，这种抗体是一种兔抗鼠抗体，能识别小鼠免疫球蛋白的所有亚类。如果您的小鼠 IgG 对 Protein A 和 G 的亲合力较弱/中等，则桥接抗体将增加珠子捕获抗体的能力，而不会显著增加背景。</p>
	<p>PCR 有问题。用于实时 PCR 的 DNA 必须在扩增前进行纯化。</p>
	<p>引物问题，确认引物的物种特异性。您可能需要重新设计您的引物。在终点 PCR 中起作用的引物并不总是在实时 PCR 中起作用。</p>
<p>PCR 产物大小正确，但条带很浅</p>	<p>上样更多 PCR 产物，或使用较小的胶孔进行琼脂糖凝胶。值得注意的是，由于 PCR 反应在对数扩增阶段停止，PCR 产物的产率可能低于典型的 PCR 扩增，后者是为了获得最大的产物产率。您还可以执行更多 PCR 循环。</p> <p>注： 在正确大小的 PCR 产物下面可能看到引物二聚体带。</p>
<p>Input DNA 样本没有 PCR 条带（但 ChIP 样本有正确的 PCR 产物）。</p>	<p>在 PCR 前对 input DNA 进行 1:10 稀释，如说明书所示</p>
	<p>Proteinase K 可能没有被完全抑制。将 Proteinase K Stop Solution 加热至室温 30 min，然后短暂涡旋震荡，然后添加推荐的 2 µl 并按推荐条件孵育。</p>
	<p>在 PCR 前用 DNA 纯化柱纯化 input DNA 将有效地解决上述任一问题。</p>
<p>ChIP 后的样本无 PCR 产物（但 input DNA 样本有正确的 PCR 产物）</p>	<p>增加 ChIP 反应中染色质的使用量，或抗体的使用量，或者两者都增加。</p>
	<p>更换抗体。</p>
<p>实时 PCR 未检测到 PCR 产物</p>	<p>在进行实时 PCR 之前，应该先纯化 DNA。我们建议在扩增前使用 Active Motif 的 Chromatin IP DNA 纯化试剂盒（货号：58002）。其单柱产量为 50 µl，每次 PCR 都使用 2 µl，为 25 个 PCR 反应提供足够的 DNA。</p>

故障/问题	建议
高背景值	<p>染色质剪切的还不够。剪切应该产生足够小的 DNA 片段，以排除从相邻的染色体序列引入的背景。但同时也需要有足够大的片段，以保证扩增子的完整。我们推荐 200-1500 bp 的片段。如果 DNA 片段太大，背景会增加。考虑增加酶消化时间。检查凝胶上的碎片大小，以评估剪切效率。</p>
	<p>抗体问题。ChIP 反应中染色质含量抗体过多。过量的抗体会导致更多的非特异性结合，这将致使背景增加。</p>
	<p>太多的模板 DNA。减少 PCR 反应中 DNA 的含量。</p>
	<p>增加洗涤次数。在大多数情况下，本手册中的清洗方案是合适的。但是，如果背景很高，可以通过以下几种方式提高清洗的严格性：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.在清洗步骤中添加 ChIP Buffer1 或 ChIP Buffer2 后，在移除缓冲液之前，轻轻地将样品搅拌几分钟。 2.进行额外清洗。ChIP Buffer 1 的供量足够每个样本多清洗两次，ChIP Buffer 2 足够额外清洗一次。 3.使用高盐缓冲液（20 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 0.1%SDS, 1%Triton X-100, 500 mM NaCl, pH 7.4）增加两次清洗过程（未提供）。这个额外的清洗过程应在使用 ChIP Buffer 1 进行清洗之后进行。然后，按照方案中的概述继续进行 ChIP Buffer 2 清洗。
	<p>封闭磁珠。提供的磁珠可直接用于大多数 ChIP。然而，对于对非特异性结合高度敏感的应用（例如克隆 ChIP DNA 或在其他应用时需要额外封闭的抗体时），可以向 ChIP 反应中添加封闭试剂。</p> <p>封闭试剂：2.5 µg/µl BSA（例如 Sigma 货号：4503），1.25 µg/µl tRNA（例如 Sigma 货号：R3629）或 2.5 µg/µl 鲑鱼精子 DNA（例如 Sigma 货号：A-7888）（这里显示的是终浓度）可以直接添加到 ChIP 反应中。这些使用量是最适使用量，可以根据需要增加。</p>

Section G 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。