Sonication ChIP Kit

RK20258

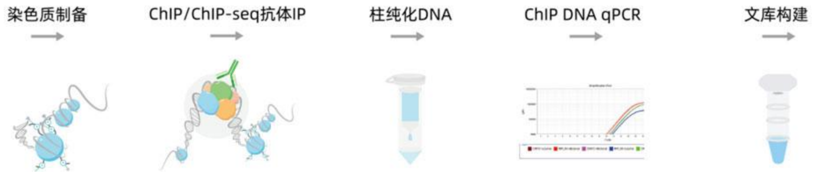
使用说明书

Version:N18K05V2.1

目录

1. 产品概述

ABclonal 开发了 ChIP-seq 全流程解决相关产品，其中包括 ChIP 试剂盒、ChIP/ChIP-seq 级别的抗体、ChIP DNA 纯化试剂盒、ChIP DNA qPCR 检测试剂、ChIP DNA 文库构建试剂盒，可为研究者提供一体化的 ChIP-seq 实验解决方案。



ChIP-seq 解决方案

Sonication ChIP Kit 是一款用于染色质免疫沉淀(Chromatin immunoprecipitation, ChIP)实验的试剂盒，是 ChIP 全流程解决方案中的一个重要环节。

主要实验步骤包括：

1）样品制备与交联：在合适的条件下处理好样本，使用终浓度为 1%的甲醛进行交联；

2）细胞核抽提和染色质超声破碎：加入 Cell Swelling Buffer 裂解细胞，再加入 ChIP Sonication Buffer 进行超声处理；

3）分析染色质片段化情况及浓度（质控）：将超声后的样本取出 50 μL，解交联后提取 DNA 并进行质检；

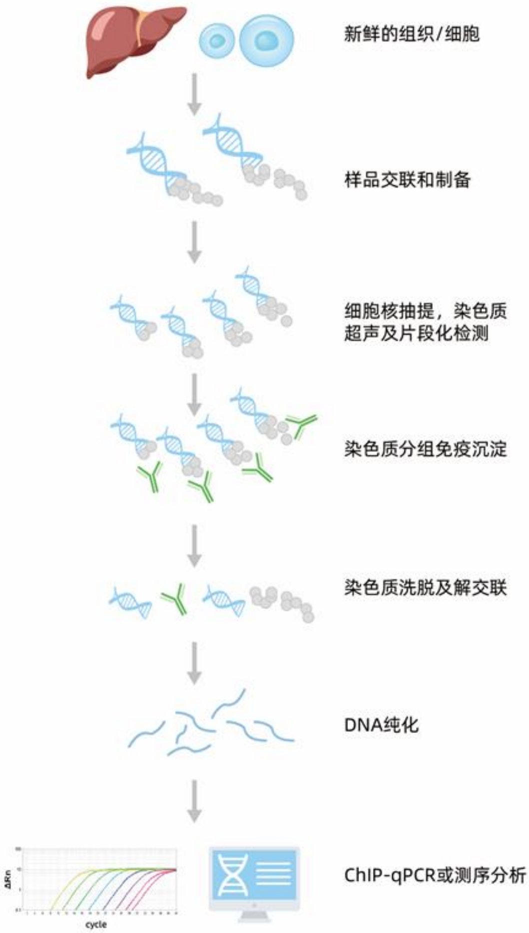
4）染色质免疫沉淀（IP）：每份超声后的样本取出 5%的样本作为 Input，取适量的剩余的超声处理的样本若干份，分别加入实验抗体、阳性抗体 H3（RM20711）、阴性抗体 IgG（RM20712）进行 IP 反应；

5）染色质洗脱并解交联：向 IP 后的样本中加入 ChIP 洗脱缓冲液，进行解交联；

6）离心柱纯化 DNA：参照说明书，对解交联后的 DNA 进行抽提；

7）qPCR 定量分析 ChIP 实验结果：按照常规 qPCR 程序进行检测，同时加上 Input 组，阳性对照组，阴性对照组及空白对照组。

试剂盒内组分均经过严格的质量控制，保证产品稳定性和可重复性。



染色质免疫沉淀(Chromatin immunoprecipitation, ChIP)流程图

2. 产品组分

模块		试剂管名称与颜色	组分货号	8 次	24 次
Box A	●	Glycine Solution (10X)	RM20700	1.5 mL	10 mL
	●	Cell Swelling Buffer (10X)	RM20701	1.8 mL	5.3 mL
	●	ChIP Sonication Buffer (10X)	RM20702	1.5 mL	4.3 mL
	○	ChIP Low Salt Wash Buffer (10X)	RM20703	1.8 mL	5.7 mL
	○	ChIP High Salt Wash Buffer (5X)	RM20704	1.8 mL X 2	10 mL
	○	LiCl Buffer (5X)	RM20705	1.8 mL	5.3 mL
	○	TE Buffer (100X)	RM20706	200 µL	580 µL
	○	ChIP Elution Buffer	RM20707	1.4 mL X 2	8 mL
	●	5 M NaCl	RM20708	200 µL	700 µL
Box B	●	1 M DTT	RM20164	32 µL	100 µL
	●	Proteinase K (20 mg/mL)	RM20713	64 µL	210 µL
	●	RNase A (10 mg/mL)	RM20709	64 µL	210 µL
	●	Human RPL30 Exon2 Primers (5 µM)	RM20710	40 µL	160 µL
	●	ChIP-Grade Histone H3 Antibody (1 mg/mL) *	RM20711	10 µL	20 µL
	●	IgG (1 mg/mL)*	RM20712	10 µL	20 µL

● 代表管盖颜色。

*，注：

1. 这两个试剂提供的量仅供测试用，不是 8 或 24 次的足量，如需更多，可自行采购（参见 4.3）。

2. 对照抗体不要反复冻融超过 10 次。

3. 请严格按照存放条件保存试剂，以防影响实验效果。

4. DTT 在 25℃水浴 10~15 min 溶解或室温溶解 15~20 min，若有白色沉淀未完全溶解可以使用移液器吹打 20 次进行溶解。

3. 保存及运输条件

运输与保存：Sonication ChIP Kit 建库试剂盒分为 Box A 和 Box B，Box A 冰袋运输，保存于 4℃；Box B 干冰运输，保存于-20℃。在合适的保存条件下，1 年有效期内试剂盒的试剂与酶组分能够保持完整活性。

4. 其他自备材料

4.1. IP相关试剂耗材

磁力架（AI20023P，AI20021P）

ChIP 级蛋白 A/G (Protein A/G, 1:1) 磁珠(RM02915)

蛋白酶抑制剂混合物 PIC (100X) (RM02916)

DNA 纯化试剂盒：ABclonal AFTSpin 多功能 DNA 回收纯化试剂盒(RK30100)

无水乙醇，**甲醛（16%）**，**1X PBS**，无核酸酶水(ddH2O)

4.2. qPCR和NGS建库试剂

qPCR mix：2X Universal SYBR Green Fast qPCR Mix (RK21203)

DNA 建库：RK20255, RK20228

4.3. 抗体

目的蛋白 ChIP 级别抗体（详见 ABclonal 官网)；

试剂盒中的阳性抗体 RM20711：ChIP-Grade Histone H3 Antibody (1 mg/mL) （Abclonal A17562）；

阴性抗体 RM20712：IgG（ Abclonal AC005）；

4.4. DNA样本浓度评估

Qubit 荧光定量仪

ABQubit 双链 DNA 定量试剂盒 (ABclonal, Cat.NO. RK30140) 或 Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher SCIENTIFIC, Cat. Q32854)

5. 实验流程

样品制备与交联 → 在合适的条件下处理好样本，使用终浓度为 1%的甲醛进行交联

↓

细胞核抽提和染色质超声破碎 → 加入 Cell Swelling Buffer 裂解细胞，再加入 Sonication Buffer 进行超声处理

↓

分析染色质片段化情况及浓度（推荐必做质控步骤) → 将超声后的样本取出 50 μL，提取 DNA 并进行质检

↓

染色质免疫沉淀（IP) → 每份超声后的样本取出 5%的样本作为 Input，取适量的剩余的超声处理的样本若干份，分别加入实验抗体、阳性抗体 H3（RM20711）、阴性抗体 IgG（RM20712）进行 IP 反应。

↓

染色质洗脱并解交联 → 向 IP 后的样本中加入 ChIP 洗脱缓冲液，进行解交联

↓

离心柱纯化 DNA → 参照说明书，对解交联后的 DNA 进行抽提

↓

qPCR 定量分析 ChIP 实验结果 → 按照常规 qPCR 程序进行检测，同时加上 Input 组，阳性对照组，阴性对照组及空白对照组

6. 操作注意事项

6.1. 一般原则

产品操作：使用前，尽量保证各试剂溶液完全融解充分无沉淀，瞬时离心至管底部。试剂盒溶液组分可以在室温下进行充分融解。使用时，Box A 组分放于室温，Box B 组分放置在冰上。产品组分使用完后，请尽快放置于合适条件下进行保存。

试剂稀释：提前将 Swelling Buffer、Sonication Buffer、ChIP Low Salt Wash Buffer、ChIP High Salt Wash Buffer、LiCl Buffer、TE Buffer 稀释至 1X，放于 4℃备用。**备注：1X buffer 放-20℃保存半年，4℃保存 2 个月。**

例如：8 次试剂；

模块	试剂管名称与颜色	组分货号	母液体积	加入 ddH_2O	总体积
Box A	Cell Swelling Buffer (10X)	RM20701	1.8 mL	16.2 mL	18 mL
	ChIP Sonication Buffer (10X)	RM20702	1.5 mL	13.5 mL	15 mL
	ChIP Low Salt Wash Buffer (10X)	RM20703	1.8 mL	16.2 mL	18 mL
	ChIP High Salt Wash Buffer (5X)	RM20704	3.6 mL	14.4 mL	18 mL
	LiCl Buffer (5X)	RM20705	1.8 mL	7.2 mL	9 mL
	TE Buffer (100X)	RM20706	200 μL	19.8 mL	20 mL

6.2. 样品类型及样品量

组织样品：每个标准的ChIP反应需要约25 mg组织样品处理后获得的染色质。当收取组织样品进行ChIP实验时，要尽量去除脂类，以及坏死等无关组织。组织样品建议立即进行交联处理。在实际工作当中，我们建议每次实验处理足量的组织，可满足后续多个免疫沉淀反应和技术性重复要求，如单次ChIP实验应包含与阴性对照（IgG），阳性对照H3抗体和目的蛋白抗体等进行免疫沉淀的足量样品。**建议以一个样品组为标准，准备约100到150 mg组织样品**（每个样品组能满足同时进行目的蛋白抗体、阴性对照IgG、阳性对照H3抗体等多个ChIP反应的用量)。

细胞样品：每个标准的ChIP反应需要约4 X 10^6个细胞处理后获得的染色质。在实际工作当中，我们建议每次实验处理足量的细胞用于满足后续多个免疫沉淀反应和技术性重复要求，如单次ChIP实验应包含与阴性对照（IgG)、阳性对照H3抗体和目的靶标蛋白抗体等进行免疫沉淀的足量样品。**以一个样品组为标准，准备约为1 X 10^7到2 X 10^7细胞**（以293T细胞为例，一般情况下，大约对应于细胞生长汇合度在90%以上的2-3个10 cm培养皿的细胞)。

6.3. 对照抗体和内参引物

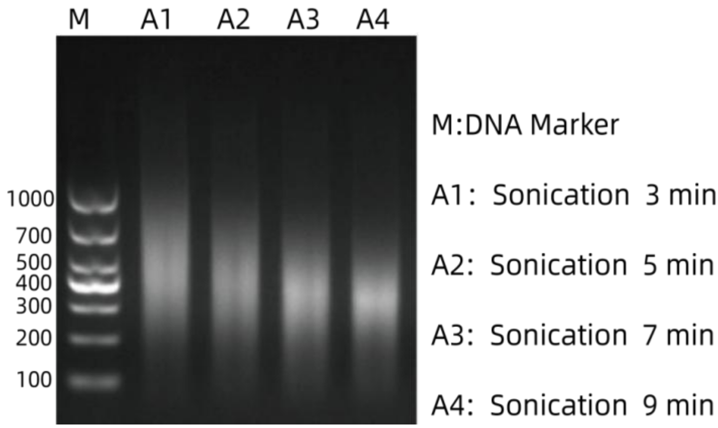
试剂盒提供阴性对照抗体(兔IgG抗体)、阳性对照抗体(组蛋白H3 ChIP级抗体)，及RPL30基因引物。组蛋白H3可以与基因组中大多数DNA序列结合，包括RPL30位点，而IgG抗体不会与任何DNA结合，我们可以使用qPCR方法检测基因富集程度和实验是否成功。

PRL30引物是针对human RPL30基因的2号exon设计，序列信息如下。若样本为小鼠或其他种属，则需自备引物。

Primer 名称	序列(5' to 3')	碱基数（bp）
Human RPL30 Exon2 Primer-F (100 μM)	CCTCACTCACCGTCTTCTTTG	21
Human RPL30 Exon2 Primer-R (100 μM)	TTGCGGGTTGCCATTTGT	18

6.4. 超声条件摸索

6.4.1. 建议在开展正式实验前，先进行预实验，以熟悉实验体系和了解并优化所用样本的各项条件。为了细胞计数，可额外准备一盘细胞用于血球计数板法测定细胞数。预实验时，需要额外准备一个细胞样品组，对染色质剪切效率和浓度进行检测。超声条件需根据超声仪器的超声功率和超声间隔时间等进行优化：一般来说，**优化后的超声条件需要能够将60%到90%的染色质片段随机打断到1 kb以下。**



使用接触式超声仪（新芝，Scientz-IID）对1 X 10^7个293T细胞进行不同时间的超声破碎，超声条件为：功率50 W，超声开1 s，关1 s。从电泳结果来看，超声时间3 min后DNA片段大小可以满足qPCR检测的需求；超声时间9 min后DNA片段大小可以满足NGS建库需求。

6.4.2. 不同超声仪器的指导建议

超声仪类型	建议使用离心管	建议超声体积（µL）
接触式探头超声仪	2 mL 体积离心管	500-1000
非接触式超声仪	1.5 mL 体积离心管	300-500
	0.2 mL 体积离心管	50-150

接触式探头超声仪：建议使用3 mm或2 mm直径微探头，设置50%以下振幅(需要摸索)，超声2 s，间隔2 s的超声循环(使用者也可以根据自身需要设定每次超声的时间、间隔时间和循环次数)，事先摸索超声条件和运行时间。然后根据摸索好的超声条件和时间进行染色质样品超声破碎，可获较理想的染色质片段化样品。在超声过程中，需保持样品一直处于冰上低温状态。不要使探头接触超声管底部或管壁，如超声过程产生泡沫，需暂停超声并调整超声管位置。

非接触式(循环降温冰水浴)超声仪：根据仪器说明书，根据待超声样品体积设定合适功率(一般500 µL以下样品，功率可以设定在50-100 W之间)，设定合适的超声循环和总运行时间。同样建议每次ChIP超声实验前，针对不同样品预先摸索超声条件和超声时间，可以做几个运行时间梯度(如1 min，2 min，3 min，4 min，5 min...)。一次超声(on)的时间，建议10 s以内，间隔时间通常建议不少于10 s。有一个参考条件：超声10 s，间隔时间20 s，运行总时间：12 min(对应于1 X 10^7细胞样品)。

延长样品交联时间或交联温度过高，会显著降低染色质超声破碎效率。另外，过度超声会破坏染色质上抗原表位，导致抗体富集效率降低引起的ChIP扩增信号下降等问题。因此，我们建议用超声处理样品时，使用可得到理想染色质片段的最少超声循环数即可。如果发现延长超声时间，也始终无法达到理想的破碎后染色质范围，建议重新制备样品。

注意：超声体积过大或浓度过高，会导致染色质片段化效率降低。**可通过将一管分成多管超声以提高片段化效率，后续实验将多管合成一管继续实验亦可。**

7. 操作步骤

7.1. 细胞样品交联和制备

7.1.1. 收集样品

以下操作以人细胞为例，收集1 X 10^7细胞放于1.5 mL EP管中；组织样品处理详见附录1；

7.1.2. 配制细胞固定液（终浓度为1%甲醛）,现配现用。

试剂	体积
1X PBS Buffer（PBS)	1 mL
16%甲醛溶液	62.5 μL
总体积	约 1 mL

7.1.3. 加入1 mL细胞固定液到对应的样品管中，吹吸混匀；冰上交联15 min，期间轻摇混匀。

7.1.4. 加入100 μL Glycine Solution (10X)，混匀；冰上孵育5min，终止交联反应，期间轻摇混匀。

备注：Glycine Solution (10X)提前取出并37℃预热；

7.1.5. 4°C，1200 g 离心5 min收集细胞，去除上清.

7.1.6. 用预冷的1 mL 1X PBS Buffer（PBS)漂洗两次。

7.1.7. 4°C，1200 g 离心5 min收集细胞，去除上清。

备注：此处可暂停实验，吸干上清后的细胞样品可保存在-80°C冰箱。若继续实验，可以进入步骤7.2;

7.2. 细胞核抽提和染色质超声破碎

以下配制试剂为一个样本的量，若多个样本则xN;

➢ 抽提细胞核：

7.2.1. 配制**细胞裂解缓冲液**（Cell Swelling Buffer (1X)+PIC+DTT）

	试剂	体积
●	Cell Swelling Buffer(1X)	2 mL
	100X PIC*	20 μL
●	1M DTT	2 μL
	总体积	约 2 mL

注：1. 100X PIC(蛋白酶抑制剂混合物)，需要客户自备，取出并预热，确保PIC完全溶解。

2. PIC试剂，DTT使用时再加入。

3. 以上全部操作需置于冰上或低温进行。

7.2.2. 加入预冷的1 mL **细胞裂解缓冲液**（Cell Swelling Buffer (1X)+PIC+DTT）重悬细胞，4°C旋转式摇床最低转速孵育10 min。

7.2.3. 4°C，5,000 g离心5 min以沉淀细胞核，去掉上清。

7.2.4. 加入预冷的1 mL **细胞裂解缓冲液**（Cell Swelling Buffer (1X)+PIC+DTT）重悬沉淀，4°C旋转式摇床最低转速孵育5 min。

7.2.5. 4°C，5000 g离心5 min以沉淀细胞核。

➢ 染色质超声破碎：

7.2.6. 配制**ChIP超声缓冲液**（ChIP Sonication Buffer (1X)+PIC+DTT）

	试剂	**体积**
●	ChIP Sonication Buffer(1X)	1 mL
	100X PIC*	10 μL
●	1M DTT	1 μL
	总体积	约 1 mL

注：1. 100X PIC(蛋白酶抑制剂混合物)，需要客户自备，取出并预热，确保PIC完全溶解。

2. PIC试剂，DTT使用时再加入。

3. 以上全部操作需置于冰上或低温进行。

7.2.7. 用1 mL **ChIP超声缓冲液**（ChIP Sonication Buffer (1X) + PIC+DTT）再次重悬沉淀，4°C旋转式摇床最低转速孵育20 min，短暂离心。

7.2.8. 最终将此样品转移到一个适宜超声的1.5 mL EP管中。

7.2.9. 超声处理染色质片段：

例如：新芝scientz-IID接触式超声仪器，1.5mL EP管置于冰上，超声探头插入液体大概1/2处；细胞：40 W，1 S开，1 S关，15 min；组织：65 W，1 S开，1 S关，15 min。

(需要实验室根据自己仪器及样品进行摸索)

7.2.10.超声破碎完成后，4°C，12000 g 离心10 min。

7.2.11.将上清转移到一个新管子中，即为交联的染色质样品，充分混匀后取50 μL染色质样品用以分析DNA分子量分布范围并确定其浓度，其他剩余片段化染色质样品保存在-80°C冰箱。在进行IP步骤（步骤7.4.2）时使用。

7.3. 分析染色质片段化情况及浓度(质控)

➢ 染色质解交联：

7.3.1. 向来自步骤7.2.11. 的50 μL染色质样品添加100 μL Nuclease-free Water，补足到150 μL，然后加入4.8 μL 5 M NaCl和2 μL RNase A (10 mg/mL)，涡旋震荡混匀，37°C孵育30 min。

7.3.2. 向7.3.1反应后产物中，加入2 μL Proteinase K(20 mg/mL)，涡旋震荡混匀，65°C孵育至少2 h。

➢ DNA 提取（以 ABclonal AFTSpin 多功能 DNA 回收纯化试剂盒(RK30100)为例）：

7.3.3. (可选）加入等体积的异丙醇溶液，振荡混匀。

7.3.4. 按照1：5比例，每管加入750 μL Buffer DB，充分混匀。体积超过550ul需要分批过柱。

7.3.5. 将溶液转入吸附柱Spin Column中，12,000 × g离心1 min，弃废液，将吸附柱Spin Column放回空收集管。

7.3.6. 在吸附柱Spin Column中加入600 μL Buffer W1（请先检查是否已加入指定体积的无水乙醇），Buffer W1加入后静置2 min，12,000 × g离心1 min，弃废液。

7.3.7. 重复步骤7.3.6一次。

7.3.8. 将吸附柱Spin Column放回空收集管中，12,000 × g离心2 min。

7.3.9. 取出吸附柱Spin Column，放入一个干净的1.5 mL离心管中，20~25℃开盖静置2 min，彻底晾干以免漂洗液中残留乙醇影响下游反应。

7.3.10.在吸附膜的中间部位加入50 μL无菌水（事先在 65-70℃水浴中加热效果更好），室温放置2 min，12000 rpm 离心2 min。如果需要较多量DNA，可将得到的溶液重新加入吸附柱中，离心1 min。

7.3.11.将每个管子中的吸附柱Spin Column取出并丢弃，离心管中的洗脱液即为纯化的DNA。

7.3.12.取10 μL样品与DNA marker同时进行1%琼脂糖凝胶电泳以确定DNA片段大小。理想的染色质需要有约60-90% DNA分子量范围在200-700 bp。

7.3.13.用qubit定量，浓度需大于50 ng/μL。**质检结果指导计算正式IP样品用量。**

7.4. 染色质免疫沉淀（IP）

➢ 抗体与靶标蛋白孵育：

7.4.1. 配制**ChIP超声缓冲液**（ChIP Sonication Buffer (1X)+PIC+DTT）

	试剂	体积
●	ChIP Sonication Buffer(1X)	1 mL
	100X PIC*	10 μL
●	1M DTT	1 μL
	总体积	约 1 mL

备注：以上全部操作需置于冰上或低温进行。

7.4.2. 在每个IP反应管加入等量片段化后的染色质样品（10-15 μg），来自步骤7.2.11)，并用ChIP超声缓冲液（ChIP Sonication Buffer (1X)+PIC+DTT）补充至总体积为500 μL。

7.4.3. 将7.4.2.稀释后的ChIP染色质，每个样品管吸取25 μL样品并转移到一个新的离心管中，作为5% 样品输入（Input）对照，不进行免疫沉淀反应，可以暂时保存在-20℃冰箱（Input样品后续会在步骤7.5.2.取出，与其他沉淀反应后染色质样品同步进行后续解交联操作）。

7.4.4. 在各个目的蛋白样品管中加入对应抗体，在各个对应阴性对照管中加入正常同型IgG，阳性对照管中加入5ug阳性抗体H3。每种抗体用量需根据相关抗体说明书及浓度进行添加，每个沉淀反应所需对应抗体量为2-5 μg，在4℃的转子上孵育至少3 h (不建议过夜)。

备注：ChIP实验中，抗体用量很关键，过多或过少的抗体都会对靶标富集度造成负面影响。

➢ Protein A/G 磁珠预处理：

7.4.5. 预处理磁珠：轻微重悬混匀ChIP级Protein A/G磁珠，每个IP样品取30 μL磁珠。

备注：为方便吸取，可在吸取磁珠前将100 μL枪头前端剪去小部分使用。

7.4.6. 加入200 μL 1X ChIP Sonication Buffer，混匀后将离心管放在磁性分离架上，将ProteinA/G磁珠吸附至管壁。

等1-2 min溶液澄清后，小心地将上清吸走。

7.4.7. (可选）加入200 μL 3% BSA溶液（TE缓冲液配制)，4°C的转子上最低转速孵育1h。孵育完成后，从磁力架上取下离心管，加入200 μL 1X ChIP Sonication Buffer清洗磁珠2次。

➢ 抗体-靶标蛋白复合物与 Protein A/G 磁珠孵育：

7.4.8. 将步骤7.4.4.反应液10,000 g离心10 s，吸取全部反应液加入到对应标记的已预处理Protein A/G磁珠管中，重新封严管子，在4°C的转子上孵育2 h。

7.4.9. 将离心管放在磁性分离架上，将ProteinA/G磁珠吸附至管壁。等1-2 min溶液澄清后，小心地将上清吸走。此上清可以暂时保留，以备查找问题时使用。

7.4.10.加入200 μL 1X CHIP Sonication Buffer，震荡混匀，稍离心，弃掉上清液。

➢ 清洗 IP 复合物

7.4.11.加入500 μL低盐漂洗液（1X ChIP Low Salt Wash Buffer），并将样品管从磁性分离架取下，在4°C转子上转动并孵育5 min。重新把样品置于磁性分离架，等1-2 min溶液澄清后，小心地将上清吸走。

7.4.12.加入1 mL高盐漂洗液（（1X ChIP High Salt Wash Buffer），并将样品管从磁性分离架取下，在4°C转子上转动并孵育5 min。重新把样品置于磁性分离架，等1-2 min溶液澄清后，小心地将上清吸走。

7.4.13.当通过预实验发现抗体非特异性吸附较强时，可以在此步加入1 mL LiCl 漂洗液（1X LiCl Buffer），并将样品管从磁性分离架取下，在4°C转子上转动并孵育5 min后，重新把样品置于磁性分离架，等1-2 min溶液澄清后，小心地将上清吸走。

7.4.14.加入1 mL TE缓冲液（1X TE Buffer），并将样品管从磁性分离架取下，不用孵育，涡旋振荡后重新把样品置于磁性分离架，等1-2 min溶液澄清后，小心地将上清吸走。

7.4.15.重复步骤7.4.14，立即进入步骤7.5.3.染色质洗脱流程。

7.5. 染色质洗脱并解交联

➢ 染色质洗脱：

7.5.1. 实验前准备：从冰箱中取出并在37°C水浴中预热 ChIP Elution Buffer，并确认SDS已完全溶解。将水浴锅或温控混匀器设定到65°C。

7.5.2. 取125 μL ChIP Elution Buffer分别加入到每组对应的5% 样品输入对照（5% Input）管中（来自步骤7.4.3）,共150 μL，室温放置直到7.5.7.步骤。

7.5.3. 在步骤7.4.15. ChIP免疫沉淀样品中加入150 μL ChIP Elution Buffer。

7.5.4. 65℃孵育30 min，中间可每隔5 min用涡旋混合器轻轻震荡（1,200 rpm），将染色质从抗体-Protein A/G磁珠上洗脱下来。此步用金属温控振荡器（即带有振荡功能的金属浴）效果最好；或在65°C的水浴锅中振荡孵育。另外，洗脱也可以在室温下的转子上进行，但洗脱效果可能不如温控振荡器完全。

7.5.5. 10,000 g离心10 s，将离心管放在磁性分离架上吸附ProteinA/G磁珠，等1-2 min使溶液澄清。

7.5.6. 小心地将每个样品管中洗脱下来的染色质上清（约150 μL）转移到一个新的离心管中，并分别标记。

➢ 染色质解交联：

7.5.7. 在7.5.6. 所有管中和7.5.2. 的 5% Input 管中，加入6 μL 5 M NaCl 和2 μL RNase A (10 mg/mL)，混匀后37℃孵育30 min，再加入2 μL Proteinase K(20 mg/mL)，混匀后并在65℃孵育4 h或者过夜孵育。

可直接进入步骤7.6.1.，或者可保存样品在-20℃冰箱，暂停操作。为了避免在低温形成沉淀，在步骤7.6.1.进行DNA纯化前，需确保样品恢复室温。

7.6. 离心柱纯化 DNA（以 ABclonal AFTSpin 多功能 DNA 回收纯化试剂盒(RK30100)为例）

7.6.1. （可选）取出所有样品管，恢复至常温后，加入等体积的异丙醇，振荡混匀。

7.6.2. 按照1：5比例，每管加入750 μL Buffer DB，充分混匀。体积超过550 μL需要分批过柱。

7.6.3. 将溶液转入吸附柱Spin Column中，12,000 × g离心1 min，弃废液，将吸附柱Spin Column放回空收集管。

7.6.4. 在吸附柱Spin Column中加入600 μL Buffer W1（请先检查是否已加入指定体积的无水乙醇），Buffer W1加入后静置2 min，12,000 × g离心1 min，弃废液。

7.6.5. 重复步骤7.6.4一次。

7.6.6. 将吸附柱Spin Column放回空收集管中，12,000 × g离心2 min。

7.6.7. 取出吸附柱Spin Column，放入一个干净的1.5 mL离心管中，20~25℃开盖静置2 min，彻底晾干以免漂洗液中残留乙醇影响下游反应。

7.6.8. 在吸附膜的中间部位加入50 μL无菌水（事先在65-70℃水浴中加热效果更好），室温放置2 min，12000 rpm离心2 min。如果需要较多量DNA，可将得到的溶液重新加入吸附柱中，离心1 min。

7.6.9. 将每个管子中的吸附柱Spin Column取出并丢弃，离心管中的洗脱液即为纯化的DNA。

7.6.10. Qubit仪器进行DNA浓度检测。回收后DNA可保存在-20°C冰箱，也可进入下游DNA建库，或者qPCR定量实验。

7.7. qPCR 定量分析 ChIP 实验结果

7.7.1. 按样品数将合适数目的PCR管或PCR板做好标记。注意包括5% 样品输入对照（Input）组，阳性对照（组蛋白H3样品）组，阴性对照（正常兔IgG样品）组，以及一个监控DNA污染的无DNA模板的空白组对照，其中5% 样品输入对照(Input）组可进行一系列的梯度稀释（不稀释，1:5，1:25，1:125）来建立一个标准曲线，检测扩增效率。

7.7.2. 每管中加入2 μL各自对应的DNA样品作为模板以及6 μL Nuclease-free Water，即Input组需要加入稀释后的Input DNA样品作为模板，而其他反应管需要按照实验设计的分组，加入对应的ChIP沉淀后获得的DNA作为模板。

7.7.3. 按每管10 μL 2X PCR Mix+2 μL 引物(对)配制总管数对应的PCR总反应液，记住计算时多算两孔以补偿分管时的体积损失。配好后，向每个PCR管中加入12 μL反应液混合物。

qPCR加样体系：(参考RK21203）

试剂	体积
2X Universal SYBR Green Fast qPCR Mix	10 μL
RPL30 Primer(5 μM)	2 μL
DNA(<50 ng)	2 μL
Nuclease-free Water	Up to 20 μL

qPCR程序:

温度	时间	循环数
95℃	3 min	1
95℃	5 s	45
60℃	30 s	
融解曲线	仪器默认设置	

7.7.4. 按照标准qPCR两步法程序(含熔解曲线反应时间)设置qPCR程序。

7.7.5. 程序运行结束后，用qPCR仪自带的程序分析定量结果，或利用下列公式自行计算，根据实验结果进行ChIP富集效率的计算。

7.7.6. Percentage of Input=5%×2 $^{(C[T]\ Input\ Sample\ -\ C[T]\ IP\ Sample)}$

8. 附录

8.1 组织样品交联条件

8.1.1. 收集样品

组织需液氮研磨或置于冰上剪碎后放于1.5 mL EP管中，100-150 mg/管；

8.1.2. 配制细胞固定液（终浓度为1%甲醛）

试剂	体积
1X PBS Buffer（PBS)	1 mL
16%甲醛溶液	62.5 µL
总体积	约 1 mL

8.1.3. 加入1 mL细胞固定液到对应的样品管中，吹吸混匀；冰上交联15 min，期间轻摇混匀。

8.1.4. 加入100 µL Glycine Solution (10X)，混匀；冰上孵育5min，终止交联，期间轻摇混匀。

备注：Glycine Solution (10X)提前取出并37℃预热；

8.1.5. 4℃，1200 g离心5 min沉淀组织样品，去除上清。

8.1.6 用预冷的1 mL 1X PBS Buffer（PBS)漂洗两次。

8.1.6. 4℃，1200 g离心5 min收集组织样品，去除上清。

备注：此处可暂停实验，吸干上清后的组织样品可保存在-80℃冰箱。若继续实验，可以进入步骤7.2;

8.2 常见问题及解决方案

问题	可能的原因	改进建议
所得超声后的染色质样品浓度过低	用于超声的细胞太少或者超声后细胞核没有完全裂解	如果染色质样品 DNA 浓度接近于 200 µg/mL，则增加染色质的加入体积使每个反应中的DNA含量达到 20 µg。
		在交联之前，对备用盘细胞计数确定实际所用的准确细胞数，并在超声处理前后用显微镜观察，确保细胞核已完全裂解。
染色质片段化不够并且所得片段过长(大于 900 bp)	细胞被过度交联。交联处理时间超过 10 min 可能会抑制染色质消化。	缩短交联处理的时间为 10 min。
	超声时，细胞太多或超声不充分	在交联之前，对备用盘细胞计数确定实际所用的准确细胞数。可参考附录 1 在实验前优化超声条件。

样品输入对照组没有 PCR 产物或很少产物	PCR 反应所加 DNA 模板量不足或是 PCR 条件不合适	增加 PCR 反应中 DNA 模板量或扩增循环数。
	加入到免疫沉淀体系中的染色质太少或者染色质被过度片段化	参考问题 1 的改进建议。
阳性对照组蛋白 H3 抗体免疫沉淀组 RPL30 基因 PCR 扩增没有条带	加入到免疫沉淀体系中的染色质太少，或者抗体加的太少，或者免疫沉淀反应时间太短	用于每个 IP 的染色质一般在 20 μg 为宜，抗体不少于 2 μg。抗体与染色质孵育不少于 3 小时，加入 Protein A/G 磁珠后共孵育不少于 1 小时。
	染色质从 Protein A/G 磁珠上洗脱不完全	最佳的洗脱条件是将样品放在 65°C 并经常混匀使微球悬浮在溶液中。
阴性对照兔 IgG 免疫沉淀组和阳性对照组蛋白 H3 免疫沉淀组在 PCR 中得到相近量的产物	加入到免疫沉淀体系中的染色质或抗体太多	用于每个 IP 的染色质一般在 20 μ g 为宜，抗体不少于 2 μg。染色质或抗体太多会导致背景很高。
	PCR 体系中模板 DNA 过多或 PCR 循环数过多	减少 PCR 体系中模板量或降低循环数。在 PCR 反应对数增长期分析结果非常重要，否则初始模板量的差异不能被精确检测。
实验抗体免疫沉淀组没有 PCR 产物	PCR 体系中 DNA 模板量不足	增加 PCR 反应中 DNA 模板量或扩增循环数。
	免疫沉淀体系中加入的抗体量不足	通常一个免疫沉淀反应需要的抗体量在 1 到 10 μg 之间。但是具体的用量因抗体而异。尝试增加免疫沉淀中的抗体量。
	所用抗体不适合免疫沉淀	更换经过验证的适于对应物种及 ChIP 应用的抗体。

武汉爱博泰克生物科技有限公司

电话：400-999-6126

邮箱：cn.market@abclonal.com

网址：www.abclonal.com.cn

地址：湖北省武汉市江夏区东湖高新区高科园 3 路精准医疗产业基地项目一期 5 号楼