

ChainFree[®] Flag 标签 ChIP 试剂盒ChainFree[®] DYKDDDDK-Tag (Flag-Tag) ChIP Kit

产品信息

货号	产品名称	规格
FI8904-12T	ChainFree [®] DYKDDDDK-Tag (Flag-Tag) ChIP Kit	12 次
FI8904-24T	ChainFree [®] DYKDDDDK-Tag (Flag-Tag) ChIP Kit	24 次

产品描述

染色质免疫共沉淀 (ChIP) 是研究体内 DNA 与蛋白结合的技术。本试剂盒采用 ChainFree[®] Anti-Flag 磁珠来高效完成 Flag 标签 (DYKDDDDK) 融合蛋白的 ChIP 实验。ChainFree[®] Anti-Flag 磁珠偶联的是经过严格筛选、优化并重组表达的无轻、重链的 Flag 抗体, 所以 IP 洗脱液中不会有抗体轻、重链污染。

实验前将 Flag 标签与目标蛋白在细胞或组织中融合表达。实验时, 先用甲醛交联细胞内的“蛋白-DNA”复合物, 裂解细胞后, 用超声波破碎 DNA 至适合的长度, 采用 ChainFree[®] Anti-Flag 磁珠捕获细胞内的 Flag 标签融合蛋白及其结合的 DNA 片段, 去除未结合的 DNA 后, 将蛋白与 DNA 解交联, 提取结合的 DNA。该 DNA 可用于后续的定量 PCR 检测 (qPCR) 或高通量测序 (seq)。

试剂盒组分

编号	名称	12T 规格	24T 规格	储存条件
①	ChainFree [®] Anti-Flag 磁珠	250 μ L	500 μ L	4 $^{\circ}$ C, 1 年
②	裂解缓冲液	7 mL	14 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
③	漂洗液	25 mL	50 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
④	洗脱缓冲液	400 μ L	800 μ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑤	10xTE 缓冲液	550 μ L	1.1 mL	4 $^{\circ}$ C, 1 年
⑥	NaCl (5 M)	260 μ L	520 μ L	4 $^{\circ}$ C, 1 年
⑦	蛋白酶抑制剂	190 μ L	380 μ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑧	RNase A	130 μ L	260 μ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑨	Proteinase K	130 μ L	260 μ L	-20 $^{\circ}$ C, 1 年
⑩	10 mL 离心管	1 个	1 个	—

***注意:** 该试剂盒包含足够完成 12 或 24 个反应的试剂, 每个反应使用 20 μ L 磁珠。由于每次 IP 实验至少需要设置一个实验组和一个阴性对照组, 因此一次实验至少需要使用 2 个反应的试剂量。

额外所需材料

1. 自备试剂: Flag 抗体 (用于 Western-Blot 检测, 辉骏产品货号 FI01104)、PBS、甲醛、甘氨酸、无水乙醇、80%乙醇、苯酚、氯仿、异戊醇、ddH₂O。
2. 所需仪器: 磁力架 (辉骏产品货号 FI7101)、混匀仪、低温离心机、超声波破碎仪。

使用说明

I 注意事项

1. 请勿干燥或剧烈涡旋磁珠, 禁止长时间置于磁场, 这些操作可能会引起磁珠聚团, 降低结合活性。
2. 为保证磁珠均匀分布, 请在使用前通过反复颠倒、轻微涡旋彻底混匀磁珠。
3. 具体样品量和孵育时间依赖于每个特定体系, 可能需要优化才能得到最大产量。
4. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

II 实验前准备工作

细胞交联

- (1) 实验组和对对照组分别取 3×10^7 个细胞, 预冷的 PBS 漂洗 2~3 次, 彻底去除培养基成分, 4°C 1000 g 离心 5 min 收集沉淀;
- (2) 加入 10 mL PBS (含 270 μ L 37% 甲醛, 甲醛终浓度为 1%) 重悬细胞, 放混匀仪上室温交联 10 min;
- (3) 加入 1 mL 1.375 M 甘氨酸, 放混匀仪上室温孵育 5 min, 之后将样品置于冰上;
- (4) 4 °C 1000 g 离心 5 min 收集细胞, 弃上清;
- (5) 加 10 mL 预冷的 PBS 漂洗细胞 2~3 次, 彻底去除交联剂成分, 4°C 1000 g 离心 5 min 收集细胞沉淀, 液氮速冻 3 min, -80 °C 保存。

III 操作步骤

1. 细胞裂解及染色质超声打断

- (1) 将样本管置于冰上, 每组加入 500 μ L ②裂解缓冲液、5 μ L ⑦蛋白酶抑制剂 (按 1% 添加), 吹打混匀。
- (2) 超声打断染色质, 超声过程样品应始终处于冰浴中, 并保持较低温度, 以防染色质过热变性; 超声条件因细胞类型和超声设备而异, 请务必提前摸索好合适的超声打断条件, 使 DNA 片段大小在合适范围; 摸索超声条件时, 可以先固定其他条件, 先确定每次超声多长时间不会导致明显发热, 再摸索不同的超声次数; 需要注意的是每次超声的体积和细胞用量最好固定, 否则就不能使用一个相对比较固定的超声条件用于后续实验。

【参考条件: 非接触式全自动超声波破碎仪, 高功率, 30 s +30 s (超声 30 s, 暂停 30 s) 超声 28 轮;
接触式超声仪, 35% 功率, 2 s +5 s (超声 2 s, 暂停 5 s) 超声 15 min。】

- (3) 4℃ 13000 g 离心 10 min，取上清至新的离心管中。
 - (4) 取 5 μL 上清进行解交联（见下述步骤 4，其中⑧RNase A 和⑨Proteinase K 的用量均为 1.5 μL），并电泳检测 DNA 片段大小；打断的 DNA 通常在 100-1000 bp 中间，ChIP-Seq 要求 DNA 片段最好在 100-500 bp 之间，ChIP-qPCR 要求 DNA 片段最好在 300~1000 bp 之间。
 - (5) 如果 DNA 片段化不成功，则将步骤(3)获得的上清液继续超声，直至获得合适大小的 DNA 片段；如果片段化成功，则从上清液中取 30 μL 作为蛋白 input，取 30 μL 作为 DNA input，剩余用于 ChIP 实验，-80℃ 保存。
- * 注意：**如果样本中目标蛋白丰度较低，或结合物间的结合较弱，可以增加初始样本量，同时等比例增加裂解缓冲液和酶抑制剂的用量，但总孵育体积最大不超过离心管体积的 2/3，体积过大可以更换大规格离心管。

2. 漂洗液准备

为了防止实验过程中的蛋白降解，需要向漂洗液中添加蛋白酶抑制剂。取出 ⑩10 mL 离心管，加入实验组和对照组总共所需的 3.8 mL ③漂洗液和 19 μL ⑦蛋白酶抑制剂（按 0.5% 添加），混合均匀，冰上保存，现配现用。如果有多组样本，请按照实际使用量配置。

3. 染色质免疫共沉淀（ChIP）

- (1) 将①ChainFree[®] Anti-Flag 磁珠上下颠倒混匀，每组取 30 μL 磁珠到新的离心管中；
- (2) 每组加入 200 μL 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (3) 重复上步操作一次；
- (4) 向磁珠中加入样本裂解液（步骤 1 制备），放混匀仪上室温孵育 1 h 或 4℃ 孵育 4 h；
- (5) 放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (6) 每组加入 500 μL 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (7) 重复上步操作一次；
- (8) 再次加入 500 μL 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，之后取 100 μL 移入新的离心管中用于蛋白检测（标注为管 1），剩余 400 μL 用于 DNA 提取（标注为管 2），两管分别放磁力架上静置 1 min 并弃上清；
- (9) 向管 1 中加入 20 μL 1×SDS-PAGE 上样缓冲液并煮沸 3 min，放磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中，该 ChIP 样本与蛋白 input 都用于诱饵蛋白的 Western-Blot 检测；
- (10) 向管 2 中加入 30 μL ④洗脱缓冲液，涡旋震荡 20s，混匀仪上室温洗脱 10~15 min，涡旋震荡 20s，1000 g 离心 20 s，放磁力架上静置 1 min，收集上清至新的离心管中，用于解交联和 DNA 提取。

4. 解交联

- (1) DNA Input 和 ChIP 样品置于 65℃ 孵育 6 h 或者过夜；
- (2) 每管加入 8 μL ⑧RNase A，颠倒混匀 10~15 次，37℃ 孵育 0.5~2 h；
- (3) 每管加入 8 μL ⑨Proteinase K，55℃ 孵育 2 h。

5. 沉淀 DNA

- (1) 每管分别加入 330 μL ddH₂O、40 μL ⑤ 10x TE 缓冲液和 400 μL 苯酚:氯仿:异戊醇混合液 (25:24:1)，颠倒混匀 10~15 次，室温 13000 g 离心 10 min，转移上层水相到新的离心管中；
- (2) 每管加入 20 μL ⑥ NaCl 和 1 mL 无水乙醇，-20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 2 h 或过夜，4 $^{\circ}\text{C}$ 16000 g 离心 30 min，去上清；
- (3) 加入 500 μL 80%乙醇洗涤沉淀，4 $^{\circ}\text{C}$ 16000 g 离心 30 min，去上清，开盖晾干乙醇；
- (4) 加入 20 μL ddH₂O，溶解沉淀 DNA，-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

问题解决

问题	可能原因	解决方案
染色质无法打断/太短	交联时间过长/过短	改善交联时长
	超声条件不合适	重新摸索超声条件
获得的诱饵蛋白量少	样品中的诱饵蛋白含量低	提高样本用量
获得的 DNA 量少	样本量不够	提高细胞用量，或增加细胞量与抗体磁珠的比例