

MERCK

Magna chip™ A/G

(目录号17-10085)

EZ-Magna chip™ A/G

(目录号17-10086)

一天染色质免疫沉淀试剂盒

仅供研究使用。
不得用于诊断。



目录

- I. 引言
- II. Magna ChIP和EZ-Magna ChIP试剂盒概述
 - Magna ChIP流程—标准方案对比一天快速方案
 - 试剂盒组分
 - 未供应的所需物料
 - 储存和稳定性
- III. ChIPAb+™验证的抗体和ChIP级抗体
- IV. ChIP工作流程概述
 - A. 染色质样品配制和免疫选择
 - B. DNA纯化和检测
- V. 染色剂免疫沉淀实验步骤
 - A. 交联和裂解(培养细胞方案)
 - B. 对分离的染色质进行超声处理,以剪切DNA
 - C. 交联蛋白/DNA的免疫沉淀(IP)
 - D. 蛋白/DNA复合物的洗脱和蛋白/
DNA复合物的反交联,获得游离DNA
 - E. 采用离心柱进行DNA纯化
 - F. 对照品的PCR
- VI. 附录A:DNA超声处理优化
- VII. 附录B:新鲜18.5%甲醛的配制
- VIII. 染色质免疫沉淀优化和故障排除

引言

染色体免疫沉淀(ChIP)是一种强有力的技术,是用于染色体DNA相关蛋白在体内分布的经典技术。这些蛋白可能是组蛋白亚单位及其转译后修饰蛋白或其它染色质相关蛋白,如转录因子、染色质调节因子等。另外,ChIP可用于鉴别与这些蛋白有关的基因组区域。反之,也可用于鉴别与基因组特定区域有关的蛋白。

ChIP方法也常常涉及蛋白-DNA和蛋白-蛋白交联、交联染色质的断裂、染色质与靶蛋白特异性抗体的免疫沉淀。在含有靶蛋白的复合物中,分离到的DNA片段可以采用若干种方法鉴别,包括PCR、DNA芯片和DNA测序。可以进行标准或定量PCR,以验证特定DNA序列(基因或基因组区域)是否与目的蛋白有关。结合ChIP和启动子或基因组芯片技术(ChIP-芯片)可以在基因组范围内对染色质有关蛋白的DNA结合位点的进行鉴定,具有准确的分辨率。关于ChIP-芯片的详细信息,请参见Magna ChIP2™用户手册(Millipore目录号17-1000、17-1001或17-1002)。或者,用染色质免疫沉淀实验中获得的DNA进行高通量测序(ChIP-Seq),在绘制整个哺乳动物基因组DNA与蛋白相互作用的图谱方面,是ChIP-芯片的强有力替代方案。关于ChIP-Seq操作的详细信息,请参考Magna ChIP-Seq™试剂盒用户手册(随目录号17-1010一起提供)。

与标准ChIP方案(耗力耗时)不同,Magna ChIP试剂盒方案可以将ChIP实验的时间从3天减少至1天。另外,更小的Magna ChIP反应体积增加了ChIP反应中抗体的相对浓度,从而减少了ChIP反应中抗体和剪切染色质的量。最后,因为这种试剂盒使用蛋白A和蛋白G磁珠的混合物,可以使用比蛋白A或G单用更广泛的抗体种属和亚型。该试剂盒可以兼容更多的抗体,避免了基于免疫沉淀实验的需要而购买不同的蛋白A或蛋白G的试剂盒。

因为Magna ChIP试剂盒使用的是磁珠,它们与自动化高通量平台兼容,因此可以同步进行大批量的ChIP反应。



Magna ChIP和 EZ-Magna ChIP 试剂盒描述

Magna ChIP试剂盒包含成功进行哺乳动物细胞ChIP实验所需要的所有缓冲液和试剂。EZ-Magna ChIP也含有Magna ChIP试剂盒的所有组分 + 必需的对照品, 如针对管家基因的阳性对照抗体、阴性对照IgG和对照引物。这些标准对照品有助于确保成功地优化和采用方案。在EZ-Magna ChIP A/G试剂盒中, 阳性对照抗体是特异性针对RNA聚合酶II CTD区域的小鼠单抗。该抗体可检测人、小鼠、大鼠和酵母来源的RNA聚合酶II。阴性对照品是正常小鼠IgG, 可作为免疫球蛋白与染色质的非特异性结合的对照。对照引物混合物可检测人GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)启动子的166个碱基对区域。在大多数生长的哺乳动物细胞中, 这一管家基因均发生组成性转录。当采用RNA聚合酶II抗体进行染色质免疫沉淀时, 可以富集GAPDH启动子DNA(以及所有RNA聚合酶II转录基因), 而采用所提供的正常小鼠IgG进行免疫沉淀时, 不会有明显的GAPDH富集。EZ-ChIP试剂盒提供的引物, 对终点和实时定量PCR均是适用的。不推荐这些引物用于人以外物种的DNA。在已经过免疫沉淀的染色质中, 检测DNA区域、目的基因或启动子时, 仍须由研究人员根据经验确定。推荐采用启动子特异性引物的PCR, 进行富集DNA的检测和分析。

关于在免疫沉淀和交联释放后的DNA纯化, Magna ChIP试剂盒结合了独特的聚丙烯离心柱; 此离心柱含有专门活化的硅胶膜过滤器; 这种过滤器可以捕获DNA, 并使它与污染蛋白和其它细胞残渣分离。配合结合缓冲液和洗涤缓冲液一起, 这种离心柱可以快速纯化染色质DNA, 无需进行苯酚-氯仿提取或乙醇沉淀。这种纯化的DNA可以直接进行各种各样的应用, 包括定量PCR、ChIP-芯片的扩增/标记、超高通量测序、ChIP克隆等。

Magna ChIP流程—— 标准方案对比一天快速方案

M采用快速Magna ChIP方案和ChIP- 验证的抗体, Magna ChIP或EZ-Magna ChIP流程(样品提取至数据分析)一天内即可完成对于含量丰富的ChIP靶标的检测。或者, 提供一种高灵敏度方案, 用于未知质量的抗体或含量较少的ChIP靶标。这两种方案之间的主要差别是免疫沉淀所需时长, 而免疫沉淀可在少至一小时或长至过夜时间进行。下面图示两种方案的比较。

标准和快速Magna ChIP方案的比较

一天快速方案

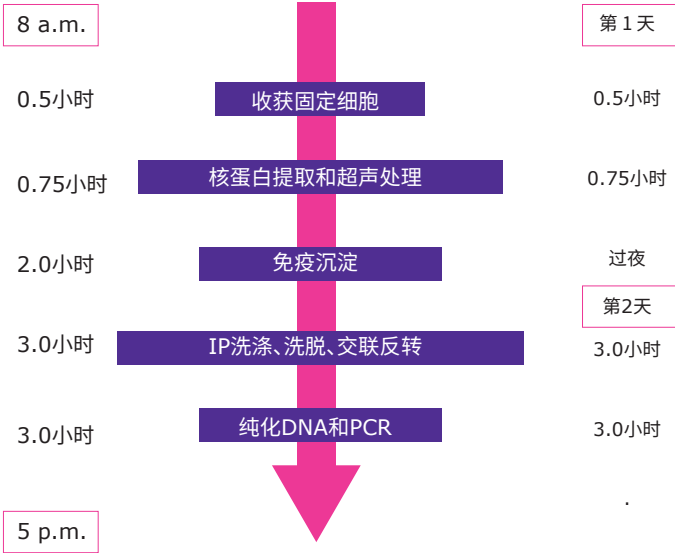


图1, 快速Magna芯片和标准方案的比较。这些方案主要在免疫沉淀所需时间方面有变化。上面所示快速方案的实例, 仅推荐在少数情况下使用。关于选择适当方案的其它指南, 请参见第9页的详细方案。

试剂盒组分

本试剂盒提供两个盒子, 含有进行22次独立染色质免疫沉淀(ChIP)反应的所有必需试剂。收到后, 请在所示温度下储存。所提供的缓冲液足以用于五个15cm细胞培养皿中获得的染色质, 每个平皿可提供10份染色质溶液(随细胞类型和分析类型而变化)。

Magna ChIP和EZ-Magna ChIP试剂盒组分		
Magna ChIP A/G (目录号17-10085)	EZ-Magna ChIP A/G (目录号17-10086)	
MAGNA0017 (在2-8°C下贮藏)	MAGNA0017 (在2-8°C下贮藏)	
MAGNA0016 (在-20°C下贮藏)	MAGNA0014 (在-20°C下贮藏)	
Magna ChIP A/G (2-8°C)		
组分	组分编号	数量
蛋白A/G磁珠	CS204457	450µL
ChIP稀释缓冲液	CS200624	12.5mL
低盐洗涤缓冲液	CS200625	12.5mL
高盐洗涤缓冲液	CS200626	12.5mL
LiCl洗涤缓冲液	CS200627	12.5mL
TE缓冲液	CS200628	12.5mL
细胞裂解缓冲液	CS200634	5mL
细胞核裂解缓冲液	CS200623	5mL
ChIP洗脱缓冲液(w/o蛋白酶K)	CS200629	5mL
10X甘氨酸	20-282	11mL
10 X PBS	20-281	24mL
收到下述组分后室温保存		
离心过滤器	20-290	22个过滤器
接收管	20-291	22个管子
结合试剂A	20-292	25mL
洗涤试剂B	20-293	12.5mL
洗脱试剂C	20-294	1.5mL
Magna ChIP A/G (-20°C)		
蛋白酶抑制剂混合物II, 200X **含有DMSO	20-283	110µL
蛋白酶K (10mg/mL)	20-298	60µL
核糖核酸酶A (10mg/mL)	20-297	60µL
RNA聚合酶II抗体, 克隆号CTD4H8	05-623B	25µg
正常小鼠IgG	12-371B	25µg
对照引物	22-004	75µL
Magna ChIP A/G (-20°C)		
蛋白酶抑制剂混合物II, 200X**含有DMSO	20-283	110µL
蛋白酶K (10mg/mL)	20-298	60µL
核糖核酸酶A (10mg/mL)	20-297	60µL

未供应的所需物料

试剂

- 🧪 根据需要刺激或处理的细胞
- 🧪 用于染色质免疫沉淀的目的抗体(请参见第7页)
- 🧪 37%甲醛
- 🧪 Taq DNA聚合酶(如NovaTaq™ Hot Start DNA聚合酶, 目录号71091)
- 🧪 dNTPs, 各2.5mM(如Novagen® 10mM dNTP混合物, 目录号71004)
- 🧪 用于qPCR的SYBR® Green Master Mix, 或用于qPCR反应的SYBR Green
- 🧪 不含脱氧核糖核酸酶和核糖核酸酶的无菌H₂O(如Millipore不含核酸酶的水, 目录号3098)

设备

- 🧪 磁力架(如Magna GrIP™ 支架, 目录号20-400或PureProteome™ 磁力架, 目录号LSKMAGS08)
- 🧪 涡旋振荡器
- 🧪 混旋仪
- 🧪 微量离心机
- 🧪 超声发生器
- 🧪 热混合机或杂交箱
- 🧪 可变温度水浴或培养箱
- 🧪 计时器
- 🧪 可变容量(5-1000µL)移液管 + 吸头
- 🧪 细胞刮棒
- 🧪 微量离心管, 1.5mL
- 🧪 热循环仪/PCR仪
- 🧪 PCR管, 0.2mL
- 🧪 带滤芯的吸头

危害:

- 🧪 在使用本品时应戴上手套。避免皮肤接触或摄入本说明书中使用的所有试剂和化学品。
- 🧪 蛋白酶抑制剂混合物含有DMSO, 避免皮肤接触。
- 🧪 染色质配制可能要求使用液氮。当处理液氮(N₂)时, 应使用个人防护设备(PPE), 避免灼伤。
- 🧪 当涉及高浓度甲醛溶液时, 使用PPE、通风橱和通气设备。甲醛吸入、皮肤接触和摄入均有毒。
- 🧪 本试剂盒中提供的结合试剂A(20-292)含有硫氰酸胍。这种化合物是一种皮肤刺激剂, 与漂白剂结合时可形成剧烈反应性的化合物。不得在这种缓冲液或含有这种缓冲液的溶液中直接加入漂白剂或酸性溶液。
- 🧪 洗涤试剂B(20-293)含有乙醇, 易燃。避免在明火附近储存或使用这种试剂。

储存和稳定性:

- MAGNA0017** 应在2-8°C下储存; 如试剂处理适当, 自收到之日起可稳定6个月。
请注意: 收到时, 在此盒中的一些组分应在室温(18-25°C)下储存。详细内容, 请参见“试剂盒组分”一节。
- MAGNA0014** 应在-20°C下储存; 如试剂处理适当, 自收到之日起可稳定6个月。
- MAGNA0016** 应在-20°C下储存; 如试剂处理适当, 自收到之日起可稳定6个月。

ChIPAb+™验证的抗体 和ChIP级抗体

关于ChIP应用,并不是所有抗体都能有效地沉淀染色质。蛋白构象、蛋白相互作用(与其它蛋白或DNA)和交联量,可能影响抗体是否在ChIP中发挥良好性能。因此,我们对所述“ChIP级”抗体和“ChIP验证”抗体做以区别。

ChIP合格或ChIP级是一个典型用于说明某抗体以前被证实能在ChIP中发挥性能的术语。虽然并不总是由供应商直接试验,许多人认为这些是ChIP“验证”的。对于一些抗体,这一验证水平是足够的。但不同批次之间,ChIP级抗体性能可能有变化。因此,在许多情况下,标记为ChIP级别的抗体在各批次之间无法发挥一致的性能。

要消除这一顾虑,当进行ChIP时,建议实验室使用有良好口碑的抗体,即已广泛评价特异性、证实在ChIP中发挥性能、且每批次都经过验证的ChIP抗体。这些类型抗体的实例就是ChIPAb+验证抗体和引物套装。ChIPAb+抗体经过严格验证,确保其特异性及免疫沉淀染色质的能力。此外,每个批次的ChIPAb+抗体均进行广泛的质控实验,包括在ChIP应用中的实验。ChIPAb+抗体并不只是高度验证的抗体。为进行独立的性能验证或用作阳性对照,所有ChIPAb+抗体还包含阴性对照IgG + PCR引物(针对已知阳性基因的引物)。部分ChIPAb+抗体列于下表。

目录号	描述
17-622	ChIPAb+三甲基组蛋白H3 (Lys27)
17-614	ChIPAb+三甲基组蛋白H3 (Lys4)
17-658	ChIPAb+乙酰组蛋白H3 (Lys9)
17-625	ChIPAb+三甲基组蛋白H3 (Lys9)
17-648	ChIPAb+二甲基组蛋白H3 (Lys9)
17-601	ChIPAb+ Sp1
17-662	ChIPAb+ EZH2, 克隆AC22
17-615	ChIPAb+乙酰组蛋白H3
17-663	ChIPAb+ EED
17-678	ChIPAb+三甲基组蛋白H3 (Lys4)
17-677	ChIPAb+二甲基组蛋白H3 (Lys4)
17-10051	ChIPAb+乙酰组蛋白H3 (Lys14)
17-10050	ChIPAb+乙酰组蛋白H3 (Lys4)
17-641	ChIPAb+ REST
17-672	ChIPAb+ RNA Pol II
17-608	ChIPAb+ HDAC1
17-10032	ChIPAb+三甲基组蛋白H3 (Lys36)
17-661	ChIPAb+ SUZ12
17-10046	ChIPAb+组蛋白H3(C-末端)

目录号	描述
17-10044	ChIPAb+ CTCF
17-681	ChIPAb+二甲基组蛋白H3 (Lys9)
17-630	ChIPAb+乙酰组蛋白H4
17-613	ChIPAb+ p53
17-603	ChIPAb+ ER
17-643	ChIPAb+单甲基组蛋白H3 (Lys27)
17-10048	ChIPAb+组蛋白H2A.Z
17-10054	ChIPAb+组蛋白H2B
17-10057	ChIPAb+ SMRT
17-10045	ChIPAb+乙酰组蛋白H4 (Lys5)
17-10098	ChIPAb+ TATA结合蛋白(TBP)
17-10131	ChIPAb+磷酸CREB (Ser133)
17-675	ChIPAb+组蛋白H3 (Unmod Lys4)
17-10130	ChIPAb+三甲基组蛋白H3 (Lys79)
17-600	ChIPAb+ CREB
17-656	ChIPAb+ Sox-2, 克隆6F1.2
17-10034	ChIPAb+ EED(免多抗)
17-685	ChIPAb+磷酸组蛋白H3 (Ser10)
17-620	ChIPAb+ RNA聚合酶II

关于Millipore's ChIPAb+验证抗体/引物套装的完整目录,请访问网址

www.merckmillipore.com/epigenetics并搜索`ChIPAb+`

要查看所有上市供应的抗体,请访问网址www.merckmillipore.com/antibodies

ChIP工作流程概述

下面列出ChIP方案中的关键步骤概述。在第8页列出Magna ChIP工作流程图。请参见第9页了解详细方案。

A. 染色质样品配制和免疫选择

细胞生长和甲醛处理: 甲醛处理使蛋白与DNA交联, 以确保共同沉淀。

细胞裂解和超声处理: 使细胞破裂, 进行超声处理, 以便把染色质剪切为可检测的尺寸。一般说来, 推荐产生200-1000bp的DNA碎片, 因为其足够小, 在检测步骤过程中可以达到较高的分辨率。至关重要的是, 采用凝胶电泳法, 根据经验确定碎片的平均大小。

免疫选择: ChIP与标准免疫沉淀法非常类似, 采用一抗 + 直接结合蛋白A或G的琼脂糖珠或磁珠。这一免疫选择步骤可富集特异性目的DNA-蛋白复合物。

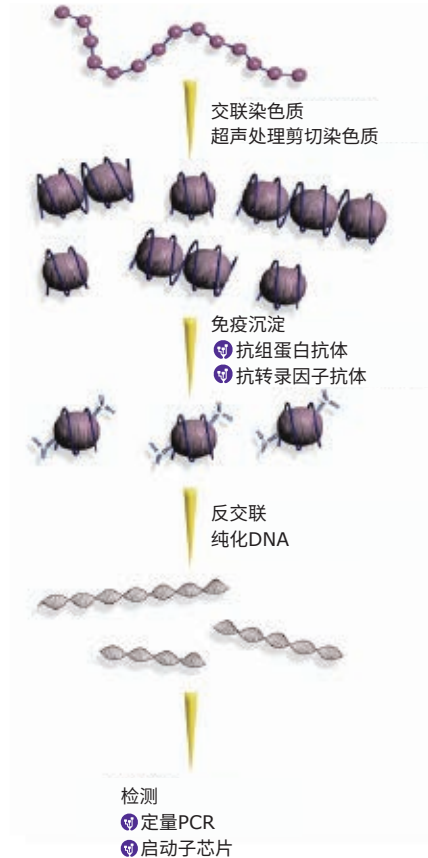
B. DNA纯化和检测

DNA纯化: 蛋白-DNA反交联; 纯化DNA, 以除去染色质相关蛋白, 并配制DNA溶液用于检测步骤。

检测: 由于可采用的多种检测方法, 该步骤是实验中最多变的。在这一步, 采用定量PCR可获得最有意义的结果。实时定量PCR (qPCR)是理想的, 但这种方法需要专门的仪器。对于标准PCR, 引物选择是至关重要的, 必须严格遵守下述指南进行设计:

引物长度:	24nt
最佳Tm:	60 °C
最佳GC:	50%
扩增子大小:	100-700碱基对

图2. Magna ChIP工作流程



在标准PCR后, 在琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶上运行跑胶, 然后进行染色并成像。

关于定量PCR, 引物设计也是至关重要的。引物设计和扩增子大小可能根据所用的qPCR方法而变化(即染料法vs. 探针法)。请咨询您的系统生产商或参照试剂中提供的引物设计指南。

详细方案

第1节: 染色质免疫沉淀(请先阅读整个方案)

A. 交联和裂解(培养细胞方案)

开始之前的准备和重要考虑:

- 🔍 在装有20mL生长培养基的150mm培养皿中培养贴壁的哺乳动物细胞,长到80%-90%的密度。如果有必要,则进行刺激或处理。
- 🔍 对于HeLa细胞,约为 1×10^7 个细胞,足以进行10次染色质免疫沉淀实验。
- 🔍 试剂盒提供的缓冲液足够从五个150mm细胞培养皿中获得染色质,每个培养皿提供的染色质溶液可用于10次实验(随细胞类型和分析类型而变化)。也可用于分离其他培养容器中的染色质,仅根据细胞数和培养容器表面积对方案进行微小修改。
- 🔍 包括一个额外的培养皿,用于细胞数预估。
- 🔍 细胞数可以根据抗体性能进行增减。例如, Magna ChIP对照抗体可以在至少 1×10^5 HeLa细胞时成功进行ChIP。为简单起见,这一方案采用 1×10^6 细胞/ChIP,以确保对照抗体的最佳表现。
- 🔍 将PBS(第3步)和培养皿置于冰块(第6步)上。
- 🔍 对每个150mm培养皿,配制42mL 1X PBS(4.2mL 10X PBS和37.8mL水),放在冰上保存。用于洗涤,必须冰上保存。
- 🔍 细胞核裂解缓冲液回至室温,以确保SDS溶解,再进行细胞裂解。
- 🔍 取出蛋白酶抑制剂混合物II,在室温下解冻,用于第3步和第13步。这种产品含DMSO,在 18.4°C 以下保持冷冻状态。

交联和细胞裂解方案

1. 在20mL培养基中加入550 μL 37%甲醛(或1100 μL 新鲜18.5%甲醛),使细胞在1%甲醛中固定。轻轻涡旋培养皿使混匀。
重要:使用高质量甲醛。不得使用已过生产商所提示有效期的甲醛。每次实验之前配制新鲜甲醛,详细情况请参见第20页附录B。
2. 在室温下培养10分钟。不必对细胞进行搅拌。
3. 在10分钟培养期间,对待处理的每个培养皿,取2mL冰上保存的1XPBS,放在另一个试管中。在每1mL 1X PBS中加入5 μL 蛋白酶抑制剂混合物II,放在冰上保存。
4. 在每个培养皿中加入2mL 10X甘氨酸,淬灭未反应的甲醛。
5. 旋涡混匀,在室温下培养5分钟。
6. 把培养皿放在冰上保存。
7. 抽吸培养基,除去尽可能多的培养基,小心不得打乱细胞。
8. 加入20mL冷的1X PBS,洗涤细胞。
9. 除去PBS,重复PBS洗涤,第8步和第9步。

10. 在每个培养皿中加入含1X蛋白酶抑制剂混合物II的2mL冷的PBS(在第3步配制)。
11. 使用无菌细胞刮棒从每个培养皿中收集细胞, 放在另一个离心管中。
12. 在4°C下按800 x g离心5分钟, 使细胞沉淀。
13. 对来自第11步的每个微量试管, 在离心过程中, 合并0.5mL细胞裂解缓冲液与2.5μL蛋白酶抑制剂混合物II。??
14. 去除上清液。
吸头: 对于从培养细胞中获得的染色质试液, 在这一点时, 固定的细胞沉淀(没有缓冲液)可以在液氮中快速冷冻, 并根据需要在-80°C下储存几个月。
15. 使细胞沉淀再悬浮于含1X蛋白酶抑制剂混合物II的0.5mL细胞裂解缓冲液中。
16. 在冰上孵育15分钟, 每5分钟涡旋一次细胞悬浮液。
🔗 可选: 孵育结束时, 在Dounce匀浆器上处理细胞悬浮液10次, 以便加速释放细胞核。
17. 细胞悬浮液用微量离心机4°C, 800 x g离心5分钟。
18. 对待处理的每个微量试管, 在离心过程中, 合并2.5μL蛋白酶抑制剂混合物与0.5mL细胞核裂解缓冲液。??
19. 小心除去上清液, 注意不得打乱细胞沉淀, 然后使细胞沉淀再悬浮于0.5mL细胞核裂解缓冲液中。
重要: 本方案中, 每 1×10^7 HeLa细胞, 推荐使用0.5mL细胞核裂解缓冲液。如果使用不同的细胞浓度, 可进行相应调整, 因为裂解缓冲液与细胞密度比对于细胞裂解是非常重要的。
20. 对裂解液进行超声处理, 以产生适当大小的染色质片段。如果已确定超声处理的最佳条件, 继续进行至B节。否则, 请参见第16页, 附录A – DNA超声处理的优化。

B.对分离的染色质进行超声处理, 以剪切DNA

开始之前的准备和重要考虑:

- 🔗 需要确定把交联DNA剪切为约200-1000个碱基对长度所要求的最佳条件(图3)。请参见附录A, 了解典型的方案。一旦优化剪切条件, 继续进行下面的步骤。



图3:DNA超声处理

剪切的染色质来自甲醛交联的HeLa细胞, 是按照Magna ChIP方案的A节(体内交联和裂解)和B节(超声处理方案, 第1-4步)及附录A(选项1)的所有步骤操作的。取20μL剪切的(泳道2)染色质, 经2%琼脂糖凝胶电泳分离, 用溴化乙锭染色。泳道2显示大部分DNA已剪切至200-1000bp长度。

超声处理方案

1. 如需要, 取来自A节(体内交联和裂解)第19步的5 μ L细胞裂产物, 进行未剪切DNA的琼脂糖凝胶分析。
 - 🔔 如果来自A节第19步的细胞裂解产物以前是冷冻的, 那么在冰上解冻。
2. 在冰上超声处理细胞裂解产物。
 - 🔔 **注意:** 必须采用附录A(DNA超声处理的优化)所述方法, 根据经验确定超声处理条件。超声处理的效果取决于细胞类型、细胞浓度和仪器。如有可能, 请查看您的仪器生产商关于仪器操作的指南。图3显示了超声处理的HeLa细胞染色质片段, 适用于Magna ChIP的示例(第10页)。
 - 🔔 **重要:** 保持细胞裂解产物在冰上保存。超声处理产生热量, 可使染色质变性。在各超声处理周期之间预留足够的时间, 以防止样品过热。
3. 在4 $^{\circ}$ C下, 按不小于10,000xg的离心力离心10分钟, 以除去不溶性物质。但是, 离心力不得超过15,000 x g, 以防止染色质丢失。
4. 如有需要, 取出5 μ L剪切的DNA溶液, 进行琼脂糖凝胶分析。
 - 🔔 遵照附录A第7步开始的方案进行琼脂糖凝胶分析。
5. 离心后的50 μ L裂解液, 取上清加到新的离心管中。
 - 🔔 每50 μ L裂解液含有1 \times 10⁶细胞的裂解产物, 足以进行一次免疫沉淀实验。
 - 🔔 所剪切的交联染色质可在-80 $^{\circ}$ C下储存3个月。

C. 交联蛋白/DNA的免疫沉淀(IP)

在开始本节之前:

- 🔔 使蛋白酶抑制剂混合物II在室温下解冻, 用于第3步。请注意这种产品含DMSO, 18.4 $^{\circ}$ C以下保持冷冻状态。
- 🔔 在第8步之前, 确保下述缓冲液放在冰上保存
 - 🔔 低盐洗涤缓冲液
 - 🔔 高盐洗涤缓冲液
 - 🔔 LiCl洗涤缓冲液
 - 🔔 TE缓冲液

免疫沉淀方案

1. 配制免疫沉淀实验所需要的、含蛋白酶抑制剂的足量稀释缓冲液, 并在冰上储存。
 - 🔔 每次免疫沉淀要求加入450 μ L稀释缓冲液和2.25 μ L蛋白酶抑制剂混合物II。
 - 🔔 关于EZ-Magna ChIP A/G(目录号17-10086), ChIP反应包括阳性对照(RNA聚合酶II抗体)和阴性对照(正常小鼠IgG)和目的抗体(用户提供)。推荐阴性对照IgG和目的抗体使用同一物种。
2. 对于每次免疫沉淀反应, 准备一支离心管, 加入50 μ L剪切的交联染色质(在B节(分离的染色质超声处理, 以剪切DNA)第5步配制的), 并放在冰上保存。如果染色质之前已冷冻, 那么放在冰上解冻。
 - 🔔 如果同一染色质要进行多次免疫沉淀实验, 那么多次试验所需要的总体积放在一个较大试管中; 对每次免疫沉淀反应, 此试管能容下0.5mL的体积。
 - 🔔 每50 μ L应含有约1 \times 10⁶细胞的染色质。

3. 在含有50 μ L染色质的每个试管中,加入450 μ L含蛋白酶抑制剂混合物II的稀释缓冲液。

🔍 如果同一染色质要进行多次免疫沉淀实验,那么根据免疫沉淀实验次数,使用适当体积的含蛋白酶抑制剂混合物II的稀释缓冲液。

4. 取5 μ L(1%)上清液作为“input”,在4 $^{\circ}$ C下保存至D节(蛋白/DNA复合物的洗脱和蛋白/DNA复合物与游离DNA的反交联),第1步。

🔍 如果根据本方案同时取不同的染色质溶液,那么从每种溶液中取1%染色质作为input。

5. 加入免疫沉淀抗体,及20 μ L完全悬浮的蛋白A/G磁珠。

重要:确保磁珠浆体混匀,再量取适当体积进行免疫沉淀,因为在较短时间后磁珠将沉积在试管底管。

🔍 阳性对照品——RNA聚合酶抗体,每管加入1.0 μ g抗体。

🔍 阴性对照品——正常小鼠IgG,每管加入1.0 μ g抗体。

🔍 用户提供的抗体和对照品,每管加入1-10 μ g抗体。适量抗体需要根据经验确定,取决于抗体滴度、纯度和特异性。

6. 在4 $^{\circ}$ C下旋转培养1小时至过夜。

🔍 Magna ChIP实验可以遵照1天或2天方案(请参见第4页,了解详细内容)进行。因此,把免疫沉淀的培养时间从过夜减少至1-4小时是可能的。这取决于许多因素(抗体、靶标基因、细胞类型等),应根据经验进行实验。

🔍 对于ChIP验证抗体或已知性能的抗体,对比过夜培养,快速方案常常可以获得相当的结果,可节省大量时间并带来大幅便利。

7. 采用磁力架(如Magna GrIP Rack [8孔],目录号20-400),沉淀蛋白A/G磁珠,完全除去上清液。

8. 按下面列出的顺序,使磁珠再悬浮于0.5mL每种冷的缓冲液中,并在旋转平台上培养3-5分钟,随后进行磁分离,小心除去上清液部分,如此洗涤蛋白A/G磁珠-抗体/染色质复合物:

- 低盐洗涤缓冲液(目录号 CS200625),洗涤一次
- 高盐洗涤缓冲液(目录号CS200626),洗涤一次
- LiCl洗涤缓冲液(目录号CS200627),洗涤一次
- TE缓冲液(目录号CS200628),洗涤一次

D. 蛋白/DNA复合物的洗脱和蛋白/DNA复合物的反交联,获得游离DNA

在开始本节之前:

🔍 蛋白酶K解冻,使ChIP洗脱缓冲液(w/o蛋白酶K)回温至室温,以确保SDS溶解,再进行。

方案

1. 配制所有免疫沉淀实验和所有input的最终洗脱缓冲液(请参见C节第4步)。对每个试管, 如下配制洗脱缓冲液:

ChIP洗脱缓冲液(w/o蛋白酶K)	100 μ L
蛋白酶K	1 μ L

2. 在62°C下振荡孵育2小时。

🔗 振荡和62°C孵育可以采用诸如Eppendorf Thermomixer®系统、Labnet振荡培养箱或标准滚瓶杂交箱等设备完成。

3. 在95°C下培养10分钟。

4. 让样品冷却至室温。

5. 采用磁力架分离磁珠。将上清液小心转移至一个新的试管中。

E. 采用离心柱进行DNA纯化

1. 对D节的每个样品管, 取1个放在接收管中的离心过滤器和一个单独的接收管。

2. 在每100 μ L DNA样品管(免疫沉淀和input)中, 加入0.5mL结合试剂“A”, 混匀。

🔗 对每1体积样品, 应使用5体积的结合试剂“A”。

🔗 可能观察到沉淀产生。不会干扰这一步骤。

3. 将样品/结合试剂“A”混合液转移至带接收管的离心柱中过滤。

4. 在不小于10,000 x g且不大于15,000 x g的离心力下离心30秒。

5. 从接收管中取出离心过滤器, 保留接收管, 弃去液体。

🔗 如果在第2步中形成沉淀, 可能在接收管底部观察到; 不会干扰这一步骤。

6. 把离心过滤器放回到同一接收管中。

7. 在接收管的离心过滤器中, 加入500 μ L洗涤试剂“B”。

8. 在不小于10,000 x g且不大于15,000 x g的离心力下离心30秒。

9. 从接收管中取出离心过滤器, 保留接收管, 弃去液体。

10. 把离心过滤器放回到同一接收管中。

11. 在不小于10,000 x g且不大于15,000 x g的离心力下离心30秒。

12. 弃去接收管和液体。

13. 把离心过滤器放入一个干净的接收管中。

14. 把50 μ L洗脱缓冲液“C”, 直接加到白色离心过滤器膜的中间。

15. 在不小于10,000 x g且不大于15,000 x g的离心力下离心30秒。

16. 取出并弃去离心过滤器。洗脱液现为纯化DNA。可立即进行分析, 或在-20°C下冷冻贮藏。

F.对照品的PCR

标准终点PCR

注意:推荐带过滤的吸头用于本节,以便尽量减少污染风险。

- 1.根据分析的样本数,标记适当数量的0.2mL PCR管,并放在冰上保存。
 - ④ 采用本试剂盒中提供的对照引物,至少有4份DNA样品进行PCR:阳性和阴性对照品免疫沉淀试管、input试管和无“DNA”试管(作为DNA污染的对照)。
 - ④ 随本EZ-ChIP试剂盒提供的对照引物,对人的GAPDH基因具有特异性。如果用于ChIP的染色质来自不同的物种,推荐用户设计物种特异性引物,并确定适当的PCR反应条件。请参考B节(DNA纯化和检测,第8页),了解引物设计指南。
- 2.在PCR管中,加入2 μ L DNA样品,并放回冰上保存。
- 3.在冰上的每个PCR反应管中,加入适量的试剂,首先加入H₂O,最后加入Taq聚合酶,如下表I所示。
 - ④ 推荐用户采用Hot-Start Taq聚合酶(如NovaTaq Hot Start DNA聚合酶,目录号71091)。如果没有采用Hot-Start Taq聚合酶,在初始变性步骤后,必须在每个试管中加入Taq。
 - ④ 如果配置主反应混合物(master mix),至少多配出一个试管的试剂,以弥补分装时体积的损失。

表I, PCR试剂体积

试剂	1次反应的体积
DNA	2.0 μ L
H ₂ O	12.6 μ L
10XPCR缓冲液(w/o MgCl ₂)	2.0 μ L
MgCl ₂ (50 mM)	0.6 μ L
2.5mM dNTP	1.6 μ L
对照引物	0.8 μ L
Taq (5U/ μ L)	0.4 μ L

- 4.把PCR反应管放在热循环仪中。
- 5.启动下述PCR反应程序:

初始变性	94 °C	3分钟
变性	94 °C	20秒
退火	59 °C	30秒
延伸	72 °C	30秒
最终延伸	72 °C	2分钟

→ 总共重复32次。

- 6.取出PCR试管。反应物可以在-20°C下储存。
- 7.取出每种PCR反应物10 μ L,采用2%琼脂糖凝胶电泳(采用100bp DNA Marker)进行分析。PCR产物的预期大小是166个碱基对。

实时定量PCR

- 1.在适用于实时定量PCR仪的平板中,加入2 μ L样品(对每份ChIP样品,推荐重复三次qPCR反应)。
- 2.如表II所示,配制主反应混合物(master mix)。配出至少多一个试管的试剂,以弥补封装时体积的损失。
- 3.在2 μ L样品中,加入23 μ L qPCR混合物。
- 4.使用盖子或光学胶带密封平板,开始qPCR反应。

表II, qPCR试剂配置和反应参数

1次反应的qPCR试剂组成:		qPCR参数:
ddH ₂ O	9.5 μ L	初始变性, 94°C, 10分钟
SYBR®-Green主混合物	12.5 μ L	变性, 94°C, 20秒
引物混合物	1 μ L	退火和延伸: 60°C, 1分钟
总计	23 μ L	

总共重复50次。

该聚合酶链反应(PCR)由下述一个或多个美国专利涵盖: 4,683,202、4,683,195和4,889,818,由Cetus Corporation发布,为Hoffman-LaRoche Molecular Systems, Inc.所有并许可。购买Magna ChIP试剂盒并不赋予使用这些专利所涵盖PCR过程的许可。在进行PCR之前,该产品买方必须获得使用这种PCR的许可。

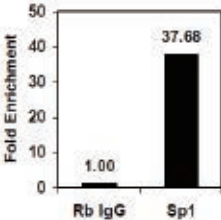


图4:富集倍数的分析:

采用4 μ g兔的normal IgG或4 μ g Sp1抗体(Sp1 ChIPAb+试剂盒中含有的组分,试剂盒目录号17-601)和Magna ChIP A+G试剂盒,对HeLa S3细胞(1 \times 10⁶细胞量/免疫沉淀)来源的、超声处理的染色质进行ChIP。采用针对DHFR的引物,经qPCR验证与Sp1相关的DNA片段。

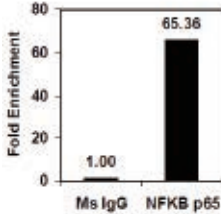


图5:富集倍数的分析:

采用4 μ g小鼠normal IgG或4 μ g NFkB p65 (RelA) 抗体(NFkB p65 ChIPAb+试剂盒中含有的组分,试剂盒目录号17-10060),对血清饥饿的、TNF α -处理(20ng/mL, 30分钟)的HEK293细胞(约3 \times 10⁶细胞量/免疫沉淀)来源的、超声处理的染色质进行染色质免疫沉淀。采用针对IkB α 的引物,经qPCR验证与NFkB p65(RelA)相关的DNA片段。

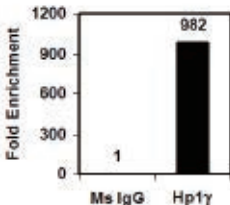


图6:富集倍数的分析:

采用5 μ g小鼠normal IgG或5 μ g Hp1 γ 抗体(Hp1 γ ChIPAb+试剂盒中含有的组分,试剂盒目录号17-646)和Magna ChIP A+G试剂盒,对HeLa S3细胞(1 \times 10⁶细胞量/免疫沉淀)来源的、超声处理的染色质进行染色质免疫沉淀。采用针对DHFR的引物,经qPCR验证与Hp1 γ 有关的DNA片段。

附录A: DNA超声处理优化

剪切交联DNA成200-1000碱基对长度的最佳条件,取决于细胞类型、细胞浓度和特异性的超声处理设备,包括电源设置和脉冲时间及脉冲数。优化超声处理的方法可能包括:

- i.在超声处理参数保持不变情况下,改变初始细胞裂解缓冲液中每mL的细胞浓度
- ii.固定细胞裂解缓冲液中每mL的细胞浓度,改变超声处理的周期和/或电源设置
- iii.两种方法合并

超声处理优化

下面列出的方案说明了按照体内交联和裂解步骤(请参见第10页)的超声处理优化。下面说明的特定条件,目的是用作优化的潜在起始点。细胞类型不同,特定条件可能会有明显的变化,这取决于所用的超声处理系统、微量吸头和细胞类型。

- I. 遵照A节(体内交联和裂解程序,第9页)第1-14步获得细胞裂解产物,但改变第15步中单位细胞量的细胞裂解缓冲液体积,以获得含有3种不同细胞浓度的离心管,浓度范围为 5×10^6 /mL~ $4-5 \times 10^7$ /mL。关于HeLa细胞,要求约 4×10^7 细胞量,或约4个15cm平板。继续遵照细胞核提取步骤至第19步。每支离心管应含有约500 μ L细胞裂解产物。
- II. 继续遵照细胞核提取步骤至第19步。

细胞裂解缓冲液的体积	细胞密度	需要的细胞数
500 μ L	5×10^6 /mL	2.5×10^6
500 μ L	2×10^7 /mL	1×10^7
500 μ L	$4-5 \times 10^7$ /mL	2.5×10^7

III. 确保随时把样品放在冰上保存。

重要: 超声处理会产生热量,此热量可能使染色质变性。

IV. 在超声处理之前,从每种条件的样本中取出 1×10^5 细胞量,用于分析未剪切DNA。

V. 根据仪器生产商指南,针对每种细胞浓度,超声处理每个离心管固定的周期数,在各周期之间的静息期。例如,使用Misonix Sonicator® 3000仪器和#419微针探头,选择6次15秒脉冲,在各次脉冲之间有50秒静息期,电源设置为6。随时保持各离心管冰上保存。

VI. 从每种条件的离心管中,取出经超声处理染色质的 1×10^5 细胞(20 μ L、5 μ L、2 μ L,从最小到最大浓度样品),放在一个新的试管中。

VII. 配制样品进行分析。在所有样品(未剪切和剪切)中,加入ChIP洗脱缓冲液至最终体积50 μ L。

分析选项1:

1. 加入1 μ L核糖核酸酶A(10mg/mL),在37°C下孵育30分钟。
2. 加入1 μ L蛋白酶K,在62°C下孵育2小时。
3. 采用100bp DNA Marker,在1%-2%琼脂糖凝胶上样10 μ L和20 μ L,进行电泳。

吸头: 选择不同的上样量,有助于避免上样量过低和过高。

4. 观察哪种剪切条件可获得在200bp-1000bp范围内的DNA smear。请参见图3(第10页)的举例。
5. 如果所得结果表明所得DNA不在预期的大小范围内,则采用修改后条件重复优化。对某一特定细胞类型,一旦确定最佳条件,建议用户不要改变每支离心管的细胞浓度或裂解产物体积,以便进行后续染色质免疫沉淀实验。

分析选项2:

1. 加入1 μ L蛋白酶K,在62 $^{\circ}$ C下培养2小时。
2. 在每50 μ L染色质样品管中加入0.25mL结合试剂“A”,混匀。
 - ⚠ 对每1体积样品,使用5体积的结合试剂“A”。
 - ⚠ 可能观察到沉淀产生。不会干扰这一步骤。
3. 取样品/结合试剂“A”混合液,加入到带离心过滤器的接收管中。
4. 在不小于10,000 \times g离心力下离心30秒。
 - ⚠ 不得超过15,000 \times g。
5. 从接收管中取出离心过滤器,保留接收管,弃去液体。
 - ⚠ 如果在第2步中形成沉淀,可能在接收管的底部观察到。不会干扰这一步骤。
6. 把离心过滤器放回到同一接收管中。
7. 在接收管的离心过滤器中,加入500 μ L洗涤试剂“B”。
8. 在不小于10,000 \times g离心力下离心30秒。
 - ⚠ 不得超过15,000 \times g。
9. 从接收管中取出离心过滤器,保留接收管,弃去液体。
10. 把离心过滤器放回到同一接收管中。
11. 在不小于10,000 \times g离心力下离心30秒。
 - ⚠ 不得超过15,000 \times g。
12. 弃去接收管和液体。
13. 把离心过滤器放入一个干净的接收管中。
14. 把50 μ L洗脱缓冲液“C”,直接加到离心过滤器膜的中间。
15. 在不小于10,000 \times g离心力下离心30秒。
 - ⚠ 不得超过15,000 \times g。
16. 采用100bp DNA Marker,在1%-2%琼脂糖凝胶上样10 μ L和20 μ L。
吸头:选择不同的上样量,有助于避免上样量过低和过高。
17. 观察哪种剪切条件可获得在200bp-1000bp范围内的DNA Smear。请参见图3(第10页)的实例。
18. 如果数据表明所得DNA不在预期的大小范围内,则采用修改后条件重复优化。对某一特定细胞类型,一旦确定最佳条件,建议用户不要改变每支离心管的细胞浓度或裂解产物体积,以便进行后续染色质免疫沉淀实验。

附录B:新鲜18.5%甲醛的配制

这一配方是用粉状甲醛配制新鲜的18.5%甲醛,以便在Magna ChIP方案中立即使用。甲醛和多聚甲醛可能产生具有刺激性的蒸汽,这两种化合物都属于可能的致癌原。当进行这一步操作时,采用适当的安全措施和个人防护设备。

1. 在一个50mL锥形塑料管中,加入4.8mL蒸馏水。
2. 加入0.925g多聚甲醛。
3. 加入35 μ L 1N KOH。
4. 用盖子紧密试管,放在装有约200mL水的一个400-600mL玻璃烧杯中。
5. 对烧杯和试管进行微波处理,直至烧杯中的水开始沸腾。
6. 取出烧杯,涡旋试管,直至多聚甲醛开始溶解。
7. 重复第5步和第6步,直至多聚甲醛完全溶解。这一步骤需要重复几次。
8. 在冰上储存至冷。
9. 立即使用。

VII. 染色质免疫沉淀优化和故障排除

步骤	可能的问题	实验建议
交联	交联不足或交联太过	<p>可能需要根据经验确定适量甲醛和适当交联时间。在固定甲醛浓度时进行交联时间调整和/或固定交联时间进行甲醛浓度调整。</p> <p>提示：组蛋白可能不需要交联，因为它们与DNA紧密结合。</p>
细胞裂解	细胞裂解不充分	重要的是，每个细胞浓度有足量的裂解缓冲液。遵照本说明书中的指南进行操作。取10 μ L细胞裂解液通过显微镜观察，检查细胞裂解液中是否有完整的细胞。
染色质剪切	超声处理不足/或太过	遵照附录A，以获得适当大小的DNA。
	由于样品过度加热引起蛋白变性	在超声处理过程中，把样品放在冰上保存。缩短每次超声处理时间，增加样品超声处理的次数。
加入一级抗体	抗体不能识别在固定染色质中的蛋白	选择针对抗原不同表位的抗体。 降低甲醛固定的量或减少甲醛固定的时间。
	染色质不足或太多	采用固定量的染色质，对抗体系列稀释进行免疫沉淀实验，或反之。
	培养时间不足	<ul style="list-style-type: none"> ④ 在4°C下，目的抗体与染色质孵育过夜。 ④ 选择具有更高亲和力的不同抗体。 ④ 进行免疫沉淀蛋白的蛋白质印迹法，验证抗体可使目的抗原免疫沉淀。
加入蛋白A/G磁珠	磁珠不足	随着时间延长，磁珠沉淀于试管底部。在取出适当体积进行免疫沉淀之前，确保蛋白A/G磁珠混匀。
	不正确的抗体种属或亚型	检查抗体种属和亚型是否可以结合蛋白A/G。不推荐蛋白A/G用于IgM或鸡Ig。
洗涤	洗涤时间不足	增加每种洗涤缓冲液的洗涤次数。
	在吸取缓冲液过程中，将琼脂糖珠吸走	在吸取缓冲液之前，确保在上清液中没有磁珠。
交联洗脱和反转	不完全洗脱	当进行洗脱时，确保温度接近60°C。在高于65°C温度时，长时间孵育会使蛋白酶K灭活。
	过度交联	交联太过可能导致不可逆反应。固定甲醛浓度，选择适合的固定时间，和/或固定时间，选择适合的甲醛浓度。

步骤	可能的问题	实验建议
PCR	退火温度或扩增条件不正确	确保在热循环仪上正确设置扩增反应程序。 再次检查引物是否有正确的 T_m 。 对基因组DNA进行PCR, 确保引物和扩增条件在预期大小的位置出现DNA条带。
	引物设计的不好	遵照在“染色质免疫沉淀分析概述, B节”中的引物设计的建议。
	无PCR产物	在PCR反应中不同程度地增加DNA的量。 增加扩增反应的周期数。
	PCR产物是smear	降低PCR反应的起始DNA量。使用HotStart Taq聚合酶, 以避免引物的非特异性退火。
	RNA聚合酶II和小鼠normal IgG 进行免疫沉淀实验获得的PCR产物之间没有量的差异	确保如说明书所示, 免疫沉淀使用了正确量的抗体和正确的染色质细胞量。太多的抗体和/或染色质可能引起非特异性结合增加。 用水稀释DNA, 以降低加至PCR反应的DNA量。 减少DNA扩增的周期数。在PCR线性扩增阶段对其产物进行分析是十分重要的, 这样可以测定起始DNA量的差异。

参考文献

一般参考文献

1. Das, PM, et al., *Biotechniques* (2004) 37: 961-969
2. Cervoni, N, and Szyf, M., *J. Biol. Chem.* (2001) 276: 40778-40787
3. Manabe, I, et al., *J. Clin. Invest.* (2001) 107: 823-834
4. Luo, RX, et al., *Cell* (1998) 92: 463-473.
5. Braunstein, M, et al., *Mol. Cell. Biol.* (1996) 16: 4349-4356
6. Soloman, MJ, et al., *Cell* (1988) 53 : 937-47

ChIP-芯片参考文献

1. Bernstein, BE, et al., *Methods Enzymol.* (2004) 376: 349-60
2. Buck MJ, and Lieb JD. *Genomics* (2004) 83: 349-360
3. Weinmann, AS, et al., *Genes Dev.* (2002) 16: 235-44

ChIP-高通量测序参考文献

1. Johnson, DS, et al., *Science* (2007) 316: 1497-502
2. Wei, CL, et al., *Cell* (2006) 124: 207-19
3. Impey, S, et al., *Cell* (2004) 119: 1041-54



上海

上海市浦东新区张江高科
晨晖路88号二号楼2楼
电话: (021)20338288
传真: (021)50803042
邮编: 201203

北京

北京市朝阳区曙光西里甲5号
凤凰置地广场A座写字楼18层
电话: (010)59898600
传真: (010)57623560
邮编: 100035

广州

广州市黄埔大道西638号
富力科讯大厦803A室
电话: (020) 37883048
传真: (020) 37883072
邮编: 510627

成都

成都市锦江区东大街正泉街
东方广场C座11楼7号
电话: (028)85288550
传真: (028)85288553
邮编: 610061

本资料中所有内容 (包括但不限于产品图片、公司logo等) 为德国默克集团所有, 未经允许, 任何人或实体不得擅自使用或转载。

更多详情, 敬请登陆: www.merckmillipore.com 技术服务电话: 400 889 1988 中国技术服务中心: asiatechserv@merckgroup.com