

MERCK

# EZ-CHIP™

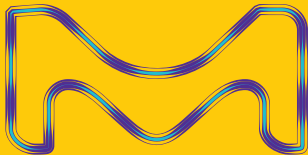
染色质免疫沉淀试剂盒

目录号17-371

使用说明书

每个试剂盒包含足够  
用于22次染色质免疫  
沉淀(ChIP)分析的试剂。

仅供研究使用。  
不得用于诊断。  
不得用于人体内。



# 目录

- I. 引言
- II. 染色质免疫沉淀实验概述
  - A. 染色质样品准备和免疫选择
  - B. DNA纯化和检测
- III. EZ ChIP™试剂盒组分
  - A. 所提供的试剂盒组分
  - B. 实验所需但未提供的组分
- IV. 染色剂免疫沉淀实验步骤
  - A. 体内交联和裂解
  - B. 超声处理断裂DNA
  - C. 交联蛋白/DNA的免疫沉淀(IP)
  - D. 蛋白/DNA复合物的洗脱
  - E. 蛋白/DNA复合物与游离DNA的反交联
  - F. 用离心柱进行DNA纯化
  - G. 对照品PCR
- V. 附录A – DNA超声优化
- VI. 附录B – 甲醛制备
- VII. 染色质免疫沉淀优化和故障排除

# I. 引言

染色质免疫沉淀(ChIP)是一种广泛使用的方法,用于鉴别与基因组某个区域有关的特异性蛋白,反之,也可用于鉴定与特异性蛋白有关的基因组区域。这些蛋白可能是在特定氨基酸处修饰的组蛋白异构体,或其它染色质相关蛋白。当采用可识别组蛋白修饰的抗体时,ChIP可用于“测定”修饰的量。比如,在不同情况下乙酰化组蛋白H3和某特异性基因启动子结合量的变化可能会改变该基因的表达。组蛋白不是唯一可采用这种技术研究的蛋白。近期关注的大部分内容是分析在整个基因组或在特异性基因位点的转录因子分布。

当进行ChIP时,首先用甲醛固定细胞,使蛋白与DNA共价交联。然后,从细胞中获取染色质,进行免疫选择过程;此过程要求使用特异性抗体。交联至目的蛋白的任何DNA序列将作为染色质复合物的一部分共同沉淀。在染色质碎片免疫选择和相关DNA纯化后,检测特异性DNA序列。如果要检测的DNA与目标蛋白或修饰的组蛋白相关,那么该DNA可以通过免疫沉淀过程增加(或富集)。

一般说来,进行标准PCR的目的,是鉴别与目的蛋白有关的DNA序列(基因或基因组区域)。通过蛋白特异性抗体分离的DNA序列的相对丰度,与使用对照抗体获得的DNA进行比较。DNA在凝胶上运行,以便对PCR产物进行定量。标准PCR更准确的替代方法是实时定量PCR(RT-qPCR)。也可以通过ChIP实验进行序列克隆,以富集与特定蛋白发生相互作用的序列,创建文库。染色质免疫沉淀+微阵列应用(ChIP-芯片)联合,是越来越受欢迎的一种新方法,可以获得蛋白-DNA相互作用或组蛋白修饰的基因组范围图谱。

EZ ChIP™ 试剂盒包含成功进行哺乳动物细胞ChIP所需要的缓冲液和试剂。重要的是,EZ ChIP™ 也包含实验必需的对照品(抗RNA聚合酶II、正常小鼠IgG和对照引物),以确保用户可以成功进行ChIP分析。RNA聚合酶II负责进行蛋白编码基因的转录,因此,其存在于转录基因的启动子区。人们认为甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)是一种管家基因,预估在大多数生长的哺乳动物细胞中均会经历转录。当采用某种抗体对RNA聚合酶II进行染色质免疫沉淀时,会使GAPDH基因(以及所有转录的基因)富集,而采用正常小鼠IgG进行的免疫沉淀则不会富集GAPDH。然后打断DNA和相关蛋白之间的共价键;在进行PCR之前纯化DNA。关于DNA纯化,EZ ChIP™ 试剂盒结合了由Mo Bio Laboratories公司生产的独特的聚丙烯离心柱。每个离心柱含有专门活化的硅膜过滤器;这种过滤器可以从污染蛋白和其它细胞残渣中捕获和分离DNA。在可溶性污染物经该过滤器离心后,洗涤该柱,然后将DNA在一种低盐缓冲液中洗脱。结合缓冲液“A”、洗涤缓冲液“B”和洗脱缓冲液“C”均由Mo Bio Laboratories提供,均不含RNase(核糖核酸酶)和DNase(脱氧核糖核酸酶)。由Mo Bio Laboratories公司提供的这种技术,可以进行染色质DNA的快速纯化,无需苯酚-氯仿提取或乙醇沉淀。纯化的DNA采用对照引物进行PCR;这种对照引物对GAPDH基因的启动子区具有特异性。

## 试剂盒描述

**数量:** 2个盒子, 含有进行22染色质免疫沉淀(ChIP)分析必须的试剂。试剂盒中的试剂足够从五个15-cm平板的细胞中获得染色质, 每个平板均获得的染色质足够10次免疫沉淀。

**贮藏和稳定性:** 收到后把各组分在标签指明的温度下贮藏。本手册第5页也指明了贮藏温度。当按照指示贮藏时, 试剂盒组分自运送日期起可稳定1年。

**用途:** EZ ChIP™试剂盒含有优化哺乳动物细胞染色质免疫沉淀的试剂, 且包括对照品, 以确保实验成功进行。试剂盒中提供的阳性对照抗体是RNA聚合酶II的小鼠单克隆抗体, 可以检测人类、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, 可以检测非特异性反应。PCR对照引物是人GAPDH启动子的166个碱基对区域。尚未评价该引物在其它物种DNA中的使用情况。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, 仍必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。

EZ ChIP™试剂盒含有所有成功进行染色质免疫沉淀分析必须的缓冲液和试剂, 但必须谨慎留意使用细节。认真遵照所有使用说明, 特别是关于培养时间和温度的使用说明。

目录号17-295	染色质免疫沉淀试剂盒
目录号17-375	EZ-Zyme染色质配制试剂盒
目录号17-245	乙酰化组蛋白H3免疫沉淀(ChIP)分析试剂盒
目录号17-229	乙酰化组蛋白H4免疫沉淀(ChIP)分析试剂盒
目录号16-157	蛋白A琼脂糖/鲑鱼精DNA
目录号16-201	蛋白G琼脂糖/鲑鱼精DNA
目录号17-610	Magna ChIP™ A染色质免疫沉淀试剂盒
目录号17-611	Magna ChIP™ G染色质免疫沉淀试剂盒
目录号17-408	EZ-Magna ChIP™ A染色质免疫沉淀试剂盒
目录号17-409	EZ-Magna ChIP™ G染色质免疫沉淀试剂盒

关于Merck ChIP验证抗体的完整目录,  
请访问网址[www.merckmillipore.com](http://www.merckmillipore.com)并搜索“ChIP”。

# II. 染色质免疫沉淀分析概述

## A. 染色质样品配制和免疫选择

**细胞生长和甲醛处理:** 这种处理使蛋白与DNA交联, 确保DNA与目的蛋白共同沉淀。

**细胞裂解和超声处理:** 使细胞破裂, 进行超声处理, 把染色质剪切为可检测的尺寸。一般说来, 200-1000bp的DNA足够小, 在检测过程中可以达到高度分辨率。至关重要, 通过凝胶电泳, 根据经验确定平均的碎片大小。

**免疫选择:** 这一步骤与标准免疫沉淀非常类似; 首先加入一抗, 然后加入蛋白G-结合琼脂糖珠。这样可以富集目的蛋白及与之特异性结合的DNA。

## B. DNA纯化和检测

**DNA纯化:** 在65°C解育时, 蛋白-DNA反转交联; 除去染色质结合蛋白, 纯化DNA, 制备的DNA用于检测步骤。

**检测:** 由于可采用方法的多样性及PCR引物选择的不同, 该步骤是实验流程中最多变的步骤。对该步骤, 采用定量PCR可获得最有意义的结果。实时定量PCR (RT-qPCR) 是理想的, 但这种方法需要专门的PCR仪器。关于标准PCR, 引物选择是至关重要的, 必须严格遵守以下指南进行设计:

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



在标准PCR后, 碎片在琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶上运行, 根据情况对凝胶进行染色和成像。

# III. EZ ChIPTM试剂盒组分

## A. 所提供试剂盒的组分

(请注意贮藏温度)

### 于4°C贮藏:

封闭的ChIP蛋白G琼脂糖珠, 目录号16-201D。一个小瓶装有结合了1.5mg BSA和约4.5mg重组蛋白G的琼脂糖珠1.5mL。琼脂糖珠占比50%, 最终体积3mL/小瓶。悬浮于含0.05%叠氮化钠的TE缓冲液(pH 8.0)中。液体悬浮剂。

ChIP稀释缓冲液, 目录号20-153。一个小瓶, 24mL。

低盐免疫复合物洗涤缓冲液, 目录号20-154。一个小瓶, 24mL。

高盐免疫复合物洗涤缓冲液, 目录号20-155。一个小瓶, 24mL。

LiCl免疫复合物洗涤缓冲液, 目录号20-156。一个小瓶, 24mL。

TE缓冲液, 目录号20-157。两个小瓶, 各24mL。

0.5M EDTA, 目录号20-158。一个小瓶, 250μL。

5M NaCl, 目录号20-159。一个小瓶, 500μL。

SDS裂解缓冲液, 目录号20-163。一个小瓶, 10mL。

1M Tris-HCl, pH 6.5, 目录号20-160。一个小瓶, 500μL。

10X甘氨酸, 目录号20-282。一个小瓶, 11mL。

10X PBS, 目录号20-281。一个小瓶, 24mL。

### 于-20°C贮藏:

蛋白酶抑制剂混合物II, 目录号20-283。两个小瓶, 各110μL 200X蛋白酶抑制剂混合物II/DMSO溶液。

核糖核酸酶A, 目录号20-297。一个小瓶, 600μg核糖核酸酶A/60μL无菌水溶液。

蛋白酶K, 目录号20-298。一个小瓶, 600μg蛋白酶K/60μL无菌水溶液。

1M NaHCO<sub>3</sub>, 目录号20-296。一个小瓶, 600μL。

对照引物, 目录号22-004。一个小瓶, 75μL 5μM每种对照引物, 对人类GAPDH具有特异性。

### FOR(正向引物):

5'-TACTAGCGGTTTTACGGGCG-3';

### REV(逆向引物):

5'-TCGAACAGGAGAGCAGAGAGCGA-3'

RNA聚合酶II抗体, 目录号05-623B。一个小瓶, 25μg抗RNA聚合酶II抗体, 克隆号CTD4H8。

正常小鼠IgG, 目录号12-371B。一个小瓶, 25μg正常小鼠IgG。

### 在室温下贮藏。

20% SDS, 目录号20-280。一个小瓶, 242μL 20% SDS。

旋转过滤器, 目录号20-290。一袋, 22个旋转过滤器 + 接收管。

接收管, 目录号20-291。一袋, 22个接收管。

结合试剂A, 目录号20-292。一个小瓶, 25mL结合试剂A。

洗涤试剂B, 目录号20-293。一个小瓶, 12.5mL洗涤试剂B。

洗脱试剂C, 目录号20-294。一个小瓶, 1.5mL洗涤试剂C。

## B. 未提供的实验所需物料

### 试剂

- 🧪 细胞, 根据实验系统所需刺激或处理
- 🧪 染色质免疫沉淀的目的蛋白抗体
- 🧪 37% 甲醛或粉状甲醛, 用于配制新鲜的18.5%溶液(请参见附录B)
- 🧪 Taq DNA聚合酶
- 🧪 dNTPs, 各2.5mM
- 🧪 不含脱氧核糖核酸酶和核糖核酸酶的无菌H<sub>2</sub>O

### 设备

- 🧪 涡旋震荡器
- 🧪 混旋仪
- 🧪 计时器
- 🧪 不同容量(5-1000 $\mu$ L)移液管 + 吸头
- 🧪 微量离心机
- 🧪 可变温度水浴锅
- 🧪 细胞刮棒
- 🧪 超声仪
- 🧪 微量离心管, 1.5mL
- 🧪 PCR仪
- 🧪 PCR管, 0.2mL
- 🧪 带滤芯的吸头

## IV. 染色剂免疫沉淀方案

### A. 交联和裂解

#### 实验之前准备:

- 🧪 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1-2 $\times 10^7$ 个细胞。获得的染色质可用于10次免疫沉淀实验(根据细胞和实验类型而不同)。
  - 🧪 包括一个额外的培养皿, 单独用于细胞数预估。
- 🧪 将PBS (请参见第3步)和培养皿放在冰块上(请参见第6步)。
- 🧪 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。
- 🧪 使SDS裂解缓冲液回温至室温, 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。

1. 在20mL培养基中, 加入550 $\mu$ L 37%甲醛(或1.15mL新鲜18.5%甲醛)进行交联, 轻轻振荡培养皿混匀。
  - 🧪 终浓度为1%。使用高质量甲醛。如果甲醛已过生产商提示的有效期, 则不得使用。在每次实验之前, 配制新鲜的甲醛, 请参见附录B。
2. 在室温下培养10分钟。
  - 🧪 无需震荡细胞。
3. 同时, 把2mL冷的1XPBS等分分装到管子里, 每个管子对应一个平皿。每毫升1XPBS中加入5 $\mu$ L蛋白酶抑制剂混合物II, 把管子放在冰上保存待用。

4. 在每个培养皿中加入2mL of 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1X PBS, 洗涤细胞。
9. 除去PBS, 重复PBS洗涤, 第8步和第9步。
10. 在培养皿中加入含1X蛋白酶抑制剂混合物II的PBS 2mL (在第3步中配制)。
11. 把每个培养皿的细胞刮到管子里
12. 在4°C下按700 x g离心2-5分钟, 沉淀细胞。
13. 离心过程中, 在每毫升 SDS裂解缓冲液中, 加入5μL蛋白酶抑制剂混合物II, 配制裂解缓冲液。
- ④ 每 $1 \times 10^7$  HeLa细胞, 推荐使用1mL SDS裂解缓冲液。如果使用不同的细胞浓度, 则进行相应调整。因为裂解缓冲液与细胞密度比对于细胞裂解非常重要。
14. 去掉上清。(在这一步骤中, 细胞沉淀可在-80°C冷冻)。
15. 使细胞沉淀再悬浮于含1X蛋白酶抑制剂混合物II的1mL SDS裂解缓冲液中。
16. 在300-400μL/微量离心管之间进行等分分装。(在这一步骤中, 裂解产物可在-80°C冷冻。)
17. 如果已确定超声处理的最佳条件, 继续进行至B节。否则, 请参见附录A。

## B. 超声处理断裂DNA

在操作开始之前:

首先确定把交联DNA剪切为约200-1000个碱基对的最佳条件。请参见附录A中的实例。确定最佳剪切条件, 继续进行下面的步骤。

1. 如有需要, 取A节第16步的细胞裂解产物5μL, 进行未剪切DNA的琼脂糖凝胶分析。
- ④ 如果A节第16步的细胞裂解产物之前已冷冻, 那么在冰上解冻。
2. 在湿冰上对细胞裂解产物进行超声处理。
- ④ 采用Cole Parmer高密度超声处理器/超声发生器(50瓦型)——配置一个2mm吸头且设置为30%的最大功率, 在湿冰上用4-5套10秒脉冲破碎HeLa细胞(细胞浓度 $1 \times 10^7$ /mL)/SDS裂解缓冲液, 获得适当长度的DNA片段。请参见图A(第10页)。
- ④ 保持细胞裂解产物冰上保存。超声处理产生热量, 可使染色质变性。
3. 4°C, 10,000 x g-15,000 x g的离心力离心10分钟, 以除去不溶物质。
4. 如有需要, 取出5μL剪切的DNA进行琼脂糖凝胶分析。
- ④ 要配制DNA溶液进行凝胶分析, 遵守附录A第7步中的方案。
5. 100μL裂解液, 取上清液加到新的离心管中。
- ④ 每100μL裂解液含有 $1 \times 10^6$ 细胞, 足够进行一次免疫沉淀。
- ④ 被剪切的交联的染色质可在-80°C下储存2个月。



## C. 交联蛋白/DNA的免疫沉淀(IP)

在实验开始之前:

- 取出蛋白酶抑制剂混合物II, 在室温下解冻, 用于第3步。这种产品含DMSO, 在 $<18.4^{\circ}\text{C}$ 下保持冷冻状态。
  - 配制免疫沉淀数所需要的、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900 $\mu\text{L}$ 稀释缓冲液和4.5 $\mu\text{L}$ 蛋白酶抑制剂混合物II。
  - 免疫沉淀应包括阳性对照(RNA聚合酶II抗体)、阴性对照(正常小鼠IgG)和目的抗体(实验者提供)。推荐实验者使用与目的抗体同一物种的阴性对照IgG。
- 根据要做的免疫沉淀实验的数量, 将含有100 $\mu\text{L}$ 已剪切的交联染色质(B节, 第5步)的微量离心管, 放在冰上保存。如果染色质之前已冷冻, 则放在冰上解冻。
  - 如果同一染色质要进行多次免疫沉淀实验, 那么把多次免疫沉淀实验所需的总体积放在一个可容下1.1mL体积的大试管中。
  - 每100 $\mu\text{L}$ 应含有约 $1 \times 10^6$ 细胞的染色质。
- 在含有100 $\mu\text{L}$ 染色质的管中, 加入900 $\mu\text{L}$ 含蛋白酶抑制剂混合物II的稀释缓冲液。
  - 如果同一次染色质要进行多次免疫沉淀实验, 根据免疫沉淀实验的次数, 确认含蛋白酶抑制剂混合物II的稀释缓冲液体积。
- 每次免疫沉淀, 加入60 $\mu\text{L}$ 蛋白G琼脂糖。
  - 蛋白G琼脂糖是50%的浆体。在移液管吸取之前, 通过倒转而轻轻混匀。
  - 这一步骤用于“预先清洗”染色质, 即除去可能与蛋白G琼脂糖非特异性结合的蛋白质或DNA。
  - 如果同一次染色质要进行多次免疫沉淀实验, 根据免疫沉淀实验的次数, 确认蛋白G琼脂糖的体积。
- 在 $4^{\circ}\text{C}$ 下, 旋转培养1小时。
- 通过短时间离心(3000-5000  $\times$  g, 离心1分钟), 沉淀琼脂糖珠。
  - 蛋白G琼脂糖珠不得高速离心。应用过高的g-离心力, 可能使小珠压碎或变形, 沉淀不一致。
- 取10 $\mu\text{L}$  (1%)上清液作为input, 在 $4^{\circ}\text{C}$ 下保存, 至D节第1步。
  - 如果根据本方案同时检测不同的染色质溶液, 那么每种染色质溶液中取1%作为input。
- 收集剩余的上清液, 等分成1mL到每个新的离心管中。弃去琼脂糖沉淀。
- 在上清液部分中加入免疫沉淀抗体:
  - 阳性对照品——RNA聚合酶抗体, 每管加入1.0 $\mu\text{g}$ 抗体。
  - 阴性对照品——正常小鼠IgG, 每管加入1.0 $\mu\text{g}$ 抗体。
  - 用户提供的抗体和对照品, 每管加入1-10 $\mu\text{g}$ 抗体。适当的抗体量须根据经验确定。
- 在 $4^{\circ}\text{C}$ 下, 旋转培养过夜。
  - 也可以减少免疫沉淀的培养时间。这取决于许多因素(抗体、基因靶标、细胞类型等), 应根据经验进行试验。
- 每个免疫沉淀反应中加入60 $\mu\text{L}$ 蛋白G琼脂糖珠, 在 $4^{\circ}\text{C}$ 下旋转培养1小时。
  - 用于收集抗体/抗原/DNA复合物。
- 通过短时间离心(3000-5000  $\times$  g, 离心1分钟), 沉淀蛋白G琼脂糖珠, 取上清液部分。

- 13.按下面列出的顺序,洗涤蛋白G琼脂糖-抗体/染色质复合物。使琼脂糖珠重悬于1mL冷的缓冲液中,并旋转解育3-5分钟,随后短时间离心(3000-5000 x g,离心1分钟),小心除去上清部分:
- 低盐免疫复合物洗涤缓冲液(目录号20-154),洗涤一次
  - 高盐免疫复合物洗涤缓冲液(目录号20-155),洗涤一次
  - LiCl免疫复合物洗涤缓冲液(目录号20-156),洗涤一次
  - TE缓冲液(目录号20-157),洗涤两次

## D. 蛋白/DNA复合物的洗脱

在开始本节实验之前:

- 使1M  $\text{NaHCO}_3$ 恢复至室温。刚拿出来时可能观察到沉淀,只要达到室温,沉淀即溶解。可以涡旋1M  $\text{NaHCO}_3$ 。
- 设置水浴至65°C,以便用于E节。
- 配制洗脱缓冲液用于所有免疫沉淀的管子和所有input的管子(请参见C节第7步)。
- 对每个管子,按照如下方式配制200 $\mu\text{L}$ 洗脱缓冲液:10 $\mu\text{L}$  20% SDS,20 $\mu\text{L}$  1M  $\text{NaHCO}_3$ ,和170 $\mu\text{L}$ 无菌蒸馏水。
- 或者,配制所有管子所需的总体积。例如,如果有10个管子,一起混合105 $\mu\text{L}$  20% SDS、210 $\mu\text{L}$  1M  $\text{NaHCO}_3$ 和1.785mL无菌蒸馏水。
- 在input管子中(请参见C节第7步),加入200 $\mu\text{L}$ 洗脱缓冲液,于室温下搁置,直至E节操作。
- 在含有抗体/琼脂糖复合物的每个管子中,加入100 $\mu\text{L}$ 洗脱缓冲液。轻弹试管混匀。
- 在室温下培养15分钟。
- 通过短时间离心(3000-5000 x g,离心1分钟),使琼脂糖珠沉淀;收集上清液,放在新的离心管中。
- 重复第4-6步,合并洗脱液(总体积=200 $\mu\text{L}$ )。

## E. 蛋白/DNA复合物与游离DNA的反交联

- 在所有管子(IPs和Inputs)中,加入8 $\mu\text{L}$  5M NaCl,在65°C下培养4-5小时或培养过夜,使DNA-蛋白反交联。在这一步骤后,样品可以在-20°C下贮藏,该方案持续至下一天。
- 在所有管子中,加入1 $\mu\text{L}$ 核糖核酸酶A,在37°C下培养30分钟。
- 在每个管子中,加入4 $\mu\text{L}$  0.5M EDTA、8 $\mu\text{L}$  1M Tris-HCl和1 $\mu\text{L}$ 蛋白酶K,在45°C下培养1-2小时。

## F. 采用离心柱进行DNA纯化

- 1.对E节的每个样品管,取1个离心过滤柱和一个接收管。
- 2.在每200 $\mu$ L DNA样品管(IPs和Inputs)中,加入1mL结合试剂“A”,混匀。
  - 🔍 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.取600 $\mu$ L样品/结合试剂“A”混合液,移至离心过滤柱中。
- 4.在不小于10,000  $\times$  g且不超过15,000  $\times$  g的离心力下离心30秒。
- 5.从接收管中取出离心过滤柱,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.取来自第2步骤的剩余600 $\mu$ L样品/结合试剂“A”混合液,移至离心过滤柱中,重复第4-6步。
- 8.在接收管的离心过滤柱中,加入500 $\mu$ L洗涤试剂“B”。
- 9.在不小于10,000  $\times$  g且不超过15,000  $\times$  g的离心力下离心30秒。
- 10.从接收管中取出离心过滤器,保留接收管,弃去液体。
- 11.把空的离心过滤器放回到同一接收管中。
- 12.在不小于10,000  $\times$  g且不超过15,000  $\times$  g的离心力下离心30秒。
- 13.弃去接收管和液体。
- 14.把离心过滤柱放入一个干净的接收管中。
- 15.把50 $\mu$ L洗脱缓冲液“C”,直接加到白色离心过滤器膜的中间。
- 16.在不小于10,000  $\times$  g且不超过15,000  $\times$  g的离心力下离心30秒。
- 17.取出并弃去离心过滤柱。接收管中的洗脱液现为纯化DNA。可立即进行分析,或在-20 $^{\circ}$ C下冷冻贮藏。

## G. 对照品的PCR

### 选项1:标准终点PCR

注意:推荐过滤式吸头用于本节实验,以便尽量减少污染风险。

- 1.根据实验的样品数,标记适当数量的0.2mL PCR管,放在冰上保存。
  - 🔍 用本试剂盒中提供的对照引物进行PCR,至少4份DNA样品:阳性和阴性对照抗体免疫沉淀管子、input的管子和“无DNA”的管子(作为DNA污染的对照)。
  - 🔍 对照引物对GAPDH基因具有特异性。对来自其它物种的DNA,推荐实验者设计适当的特异性引物(采用第4页所述指南),并根据经验确定PCR反应条件。

2. 在PCR管中, 加入2 $\mu$ L适当的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H<sub>2</sub>O, 最后加入Taq聚合酶, 如表I所示。
- ④ 推荐实验者采用Hot-Start Taq聚合酶。如果用户没有采用Hot-Start Taq聚合酶, 在初始变性步骤后, 必须在每个管中加入Taq。
- ④ 如果配置反应混合物, 需配制足够多用于一个管子的试剂量, 以弥补在分装过程中的损失。

表I, PCR试剂体积

试剂	1次反应的体积( $\mu$ L)
DNA	2.0
H <sub>2</sub> O	13.2
10X PCR缓冲液	2.0
2.5mM dNTP	1.6
对照引物	0.8
Taq (5U/ $\mu$ L)	0.4

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	➔ 总共重复32次。
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	

6. 取出PCR管。反应物可在-20°C下贮藏。

7. 取出每种PCR反应物10 $\mu$ L, 采用4%琼脂糖凝胶电泳(采用100bp DNA marker)进行分析。GAPDH阳性对照品PCR产物的预期大小是166个碱基对。请参见图B(如下)的举例。

### 选项2: 实时定量PCR

1. 在实时定量PCR仪的平板中, 加入2 $\mu$ L样品(对每份ChIP样品, 推荐重复三次qPCR反应)。
2. 如表II所示, 配制反应混合物, 需配制足够多用于一个管子的试剂量, 以弥补在分装过程中的损失。
3. 在2 $\mu$ L样品中, 加入23 $\mu$ 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试剂设置和运行参数

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

➔ 总共重复50次。

该PCR反应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EZ 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过程的许可。

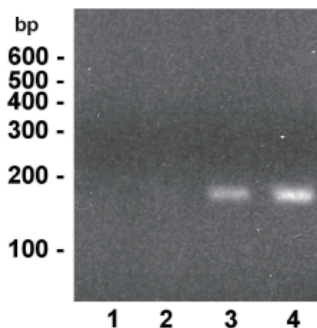
图A. DNA超声处理

来自甲醛交联HeLa细胞的、剪切的和未剪切的染色质, 按照EZ ChIP方案的A节(所有步骤)和B节(第1-4步)以及附录A(第7-11步)进行配制。然后, 20μL未剪切(泳道1)和剪切(泳道2)染色质, 经2%琼脂糖凝胶电泳, 并用溴化乙锭染色。泳道2显示大部分DNA已剪切至200-1000bp长度。



图B. 染色质的PCR分析免疫沉淀

染色质免疫沉淀是采用来自HeLa细胞的染色质及抗RNA聚合酶II(目录号05-623)或正常小鼠IgG(目录号12-371)作为免疫沉淀抗体进行的。然后采用GAPDH启动子特异性对照引物, 通过PCR法分析DNA。在使用RNA聚合酶II抗体的ChIP(泳道3)中观察到PCR产物, 未在正常小鼠IgG的ChIP(泳道2)中观察到。GAPDH启动子特异性DNA也是在input(泳道4)中观察到, 未在“无DNA”PCR对照(泳道1)中观察到。



# V.附录A:DNA超声处理优化

将交联DNA剪切成200-1000碱基对长度的最佳条件,取决于细胞类型、细胞浓度和超声仪的型号,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细胞的浓度
- ii. 选择细胞裂解缓冲液的每mL细胞固定浓度,改变超声处理的周期和/或电源设置
- iii. 两种方法合并

下面列出的方案说明了按照选项(i)的情况优化,仅作为示例。

1. 遵照A节第1-16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,以获得含有不同细胞浓度的3支离心管,浓度范围为 $5 \times 10^6$ /mL至 $4-5 \times 10^7$ /mL。关于HeLa细胞,要求约 $4 \times 10^7$ 细胞当量,或约4个15cm平板。继续遵照细胞裂解程序至第16步,根据下表调整每个样品的浓度。每支离心管含有约500 $\mu$ L细胞裂解产物。

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

2. 确保随时把样品放在湿冰上保存。  
⚠ 超声处理会产生热量,此热量可能使染色质变性。
3. 在超声处理之前,从每种条件中取出 $1 \times 10^5$ 细胞,用于分析未剪切DNA。
4. 根据仪器生产商指南,确定每种细胞浓度,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Misonix3000仪器和#419微针探头,使用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。随时保持各试管冰上保存。
5. 从每种条件的离心管中取出经超声处理染色质的 $1 \times 10^5$ 细胞(20 $\mu$ L、5 $\mu$ L、2 $\mu$ L,从最小到最大浓度样品),放在一个新的试管中。
6. 在所有样品(未剪切和剪切)中,加入ChIP稀释缓冲液至最终体积50 $\mu$ L。

## 选项1:

1. 加入1 $\mu$ L核糖核酸酶A(10mg/mL,实验者提供),在37°C下培养30分钟。
2. 加入1 $\mu$ L蛋白酶K,在62°C下培养2小时。
3. 采用100bp DNA marker,在1%-2%琼脂糖凝胶上样10 $\mu$ L和20 $\mu$ L。  
⚠ 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条带。请参见图A(第10页)的举例。
5. 如果结果表明DNA不在预期的大小范围内, 则重复优化剪切条件。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。

#### 选项2:

1. 加入1 $\mu$ L蛋白酶K, 在62 $^{\circ}$ C下培养2小时。
2. 在每50 $\mu$ 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, 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, 移至离心过滤柱中。
4. 在不小于10,000 x g且不超过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柱, 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 $\mu$ L洗涤试剂“B”。
8. 在不小于10,000 x g且不超过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柱, 保留接收管, 弃去液体。
10. 把离心过滤柱放回到同一接收管中。
11. 在不小于10,000 x g且不超过15,000 x g的离心力下离心30秒。
12. 弃去接收管和液体。
13. 把离心过滤柱放入一个干净的接收管中。
14. 把50 $\mu$ L洗脱缓冲液“C”, 直接加到白色离心过滤器膜的中心。
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。取出和弃去离心过滤柱。该洗脱液含有纯化的DNA。
16. 采用100bp DNA marker, 在1%-2%琼脂糖凝胶上样10 $\mu$ L和20 $\mu$ L。
  - Ⓢ 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条带。请参见图A(第10页)的举例。

如果结果表明所得DNA不在预期的大小范围内, 则重复优化剪切条件。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。

# VI.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EZ ChIP™实验中立即使用。进行这一程序时,采用适当的安全措施。

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 $\mu$ L 1N KOH。
4. 用盖子盖紧管子,放在一个装有约200mL水的400-600mL玻璃烧杯中。
5. 对烧杯 + 管子进行微波处理,直至烧杯中的水开始沸腾。
6. 取出烧杯,涡旋锥形管,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. 在冰上贮藏至冷。
9. 立即使用。

## 参考文献:

- Das PM, et al., *Biotechniques* 37: 961-969, 2004.  
Luo, R.X., et al., *Cell* 92: 463-473, 1998.  
Braunstein, M., et al., *Mol. Cell. Biol.* 16: 4349-4356, 1996.  
Manabe, I., et al., *J. Clin. Invest.* 107: 823-834, 2001.  
Cervoni, N., & Szyf, M., *J. Biol. Chem.* 276: 40778-40787, 2001.

## ChIP-芯片实验参考文献

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



## 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结合紧密。</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 μL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。缩短时间,增加样品超声处理的次数。
加入一抗	抗体不能识别在固定染色质中的蛋白	<p>选择针对抗原不同表位的抗体。如有可能,选择经验证适合进行ChIP的抗体。</p> <p>降低甲醛固定的量或减少甲醛固定的时间。</p>
	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。
	孵育时间不足	<p>🔗 在4°C下,目的蛋白的抗体与染色质孵育过夜。</p> <p>🔗 选择具有更高亲和力的不同抗体。</p> <p>🔗 将免疫沉淀下来的蛋白进行WB检测,确保抗体可使目的抗原免疫沉淀。</p>
加入蛋白G琼脂糖	没有加入足够的琼脂糖珠	蛋白G琼脂糖珠是悬浮于缓冲液中的。随着时间延长,琼脂糖珠会沉淀于管子底部。在取出适当体积进行免疫沉淀之前,确保蛋白G琼脂糖珠混匀。
	不正确的抗体种属或亚型	检查抗体的种属或亚型是否可以结合蛋白G。IgM或鸡Ig不推荐用蛋白G。
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	<p>🔗 在吸取缓冲液之前,确保在上清液中没有琼脂糖珠。</p> <p>🔗 在推荐的g离心力下离心。</p>
洗脱	洗脱不完全	采用pH试纸检查1M NaHCO <sub>3</sub> 的pH约为9。如果不是,请重新配制新鲜溶液。
交联反转	温度错误; 时间不足	<p>🔗 蛋白-DNA交联在65°C下反转。需要至少4小时。</p> <p>🔗 交联太过可能导致不可逆的反应。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。</p>

步骤	可能的问题	实验建议
PCR	退火温度或扩增条件不正确	<ul style="list-style-type: none"> <li>④ 确保在热循环仪上正确设置扩增反应程序。</li> <li>④ 再次检查引物是否有正确的<math>T_m</math>。</li> <li>④ 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。</li> </ul>
	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	<ul style="list-style-type: none"> <li>④ 在PCR反应中不同程度地增加DNA的量。</li> <li>④ 增加扩增反应的周期数。</li> </ul>
	PCR产物是smear	<ul style="list-style-type: none"> <li>④ 在PCR反应中不同程度地减少DNA的量。</li> <li>④ 使用HotStart Taq聚合酶, 以避免引物的非特异性退火。</li> </ul>
	RNA聚合酶II抗体和小鼠normal IgG 免疫沉淀获得的PCR产物没有量的差异	<ul style="list-style-type: none"> <li>④ 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的是十分重要的, 这样可以测定起始DNA量的差异。</li> <li>④ 按照实验操作步骤, 确保免疫沉淀实验中抗体和染色质的用量是适当的。太多的抗体和/或染色质可能引起非特异性结合增加。</li> <li>④ 用水稀释DNA, 降低PCR反应中的DNA量。</li> </ul>





#### 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芷泉街  
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](http://www.merckmillipore.com) 技术服务电话: 400 889 1988 中国技术服务中心: [asiatechserv@merckgroup.com](mailto:asiatechserv@merckgroup.com)