



CHIP(染色质免疫共沉淀)实验报告

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
多功能酶标仪	PerkinElmer	EnSight
低温研磨仪	上海净信	JXFSTPRP-CLN
台式高速低温冷冻离心机	湖南恒诺仪器设备有限公司	2-16R
复合特子离心机	申花科技	SH-Mini7KS
涡旋振荡仪	JOANLAB	VM-500S-2
迷你磁力搅拌器	LICHEN	LC-MS-M2
翘板摇床	申花科技	SH-RS100E
垂直电泳仪	申花科技	SVE-2
蛋白转印槽	申花科技	SH-ZYZ10T
电泳仪电源	申花科技	SH-DDY10P
干式金属浴	申花科技	SH-G100
移液器 0.1-2.5 μ L	Eppendorf	3123000217
移液器 0.5-10 μ L	Eppendorf	3123000020
移液器 2-20 μ L	Eppendorf	3123000098
移液器 10-100 μ L	Eppendorf	3123000047
移液器 20-200 μ L	Eppendorf	3123000055
移液器 100-1000 μ L	Eppendorf	3123000063
移液器 500-5000 μ L	Eppendorf	3123000071
超声细胞破碎仪	新芝	Scientz-IID
化学发光成像系统	申花科技	SH-COMPACT523
荧光定量 PCR 仪	Thermo Fisher	QuantStudio5
超净工作台	上海领仪	BSC-1300IIA2
凝胶成像系统	申花科技	SH-510
全自动雪花制冰机	雪科电器	IMS-40

2、主要实验试剂



试剂名称	厂家	货号
IP 裂解液	Beyotime	P0013
蛋白酶抑制剂混合物(通用型, 100X)	Beyotime	P1005
PMSF (100 mM)	Beyotime	ST506
磷酸酶抑制剂混合物 A (50X)	Beyotime	P1081
BCA 蛋白定量试剂盒	Beyotime	P0010
SDS-PAGE 上样缓冲液 (5×)	Beyotime	P0015
10% SDS-PAGE 预制胶	Beyotime	P0690 系列
预染蛋白 Marker (10–180 kDa)	Beyotime	P0071
PVDF 膜 0.45um	Beyotime	FFP39
脱脂奶粉	Beyotime	P0025
ECL Plus 超敏发光试剂盒	Beyotime	P0018
ECL 化学发光试剂盒	Beyotime	P0018A
兔冰浴 Western 超快速转膜液 (10X)	Beyotime	P0573-2L
碱性琼脂糖凝胶电泳缓冲液 (10X)	Beyotime	ST466-500ml
TBST 缓冲液 (10×)	Beyotime	ST825
辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)	Beyotime	A0208
辣根过氧化物酶标记驴抗山羊 IgG(H+L)	Beyotime	A0181
辣根过氧化物酶标记山羊抗大鼠 IgG(H+L)	Beyotime	A0192
辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)	Beyotime	A0216
琼脂糖 Agarose	Beyotime	D1100
免疫沉淀试剂盒	Beyotime	P2179M
PCR 纯化试剂盒/DNA 纯化试剂盒	Beyotime	D0033
无水乙醇	沪试	64-17-5
BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (含示踪染料)	Beyotime	D7601M

二. CHIP 实验步骤

第一天:

(一) 细胞的甲醛交联与超声破碎

- 1、取出 1 平皿细胞, 测量培养基体积, 按照终浓度为 1%的比例加入 37%甲醛;
- 2、37°C 孵育 10min; (恒温培养箱)

- 3、终止交联：按照终浓度为 125mM 的比例加 2.5M 甘氨酸于平皿中。混匀后，在室温下放置 5min 即可；
- 4、吸尽培养基，用冰冷的 PBS 清洗细胞 3 次；
- 5、用 PBS 将细胞刮下来，2000g 离心 5min，去上清；
- 6、加入含蛋白酶抑制剂的 IP 裂解液裂解细胞（裂解液的量视细胞沉淀量而加）；
- 7、冰上充分裂解 30min，过程中用枪反复吹打细胞（或者放在漩涡混匀器上震荡），使其充分裂解；
- 8、超声破碎：30%功率，4.5S 超声，10.5S 间隙；5min，总计超声次数 20 次。超声过程中请一定要注意要保持样品处于冰浴中，避免超声出现泡沫，并且处于较低温度；

（二）除杂及抗体哺育

- 1、超声破碎结束后，12000rpm，4°C，离心 10min。去除不溶物质，取上清；留取 90μl 做 input，其余保存于-80 度。（取样①input 实验）
- 2、取 40μl 留作 Input 的超声破碎产物，加入 10μl 5*还原型蛋白上样缓冲液，加热变性后进行 WB 检测，确认样品中含有目标蛋白。剩下 50μl 产物加入 5μl 的蛋白酶 K 和 2μl 5M NaCl（NaCl 终浓度为 0.2M），55°C过夜解交联；
- 3、解交联结束后，测核酸浓度，取部分样品进行 PCR 扩增，然后跑琼脂糖电泳，检测超声破碎的效果和确认样品中含有目标 DNA；
- 4、Input 结果确认后，取冻存在-80°C冰箱中的超声破碎产物 100μl，加入 900μl 含 1mM-PMSF 的 ChIP Dilution Buffer 和 20μl 的 50×PIC（蛋白酶抑制剂）。再各加入 60μl Protein A +G Agarose/Salmon Sperm DNA。4°C颠转混匀 1h；
- 5、1h 后，在 4°C静置 10min 沉淀，4000rpm 离心 5min；
- 6、将样品分装至两支 1.5mL EP 管，一管中加入目的蛋白 IP 抗体 1μg，另一管中加入对应种属的 IgG 1μg。4°C颠转过夜；

第二天：

（一）免疫复合物的沉淀及清洗

- 1、孵育过夜后，每管中加入 200μl Protein A+G Agarose/Salmon Sperm DNA，4°C颠转 2h；
- 2、4°C静置 10min 后，4000rpm 离心 1min。除去上清；
- 3、依次用下列溶液清洗沉淀复合物。清洗的步骤：加入溶液，轻轻颠倒，4000rpm 离心 3min，去除上清；

洗涤溶液：a. low salt wash buffer----one wash

b. high salt wash buffer-----one wash

c. LiCl wash buffer-----one wash

d. TE buffer-----two wash

注：完成上述所有洗涤步骤后所获得的沉淀即可用于 Western 检测，在完成所有的洗涤步骤后，取 30μl 样品加入 30μl SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(1X)，沸水浴煮沸 10 分钟后上样进行 WB；（取样②IB 实验）

- 4、现配 elution buffer（0.5gSDS+0.42gNaHCO₃+50ml 水），加 200μl 至 EP 管；
- 5、加 5M NaCl 8μL，Protease K 20μL，55°C过夜解交联；

第三天:

(一) DNA 样品的回收

1. 取解交联后样本（体积为 200 μ l），向离心管中加入 200 μ L Buffer GB，颠倒混匀，70 $^{\circ}$ C 放置 10 min；
2. 向离心管中加入 200 μ L 无水乙醇，颠倒混匀，此时可能会出现絮状沉淀，12,000 rpm 离心 2 min，将上清液转移至 Nuclease-free 离心管中，尽量避免吸取沉淀；
3. 向装有上清液的离心管中加入 20 μ L SweMag Beads（SweMag Beads 使用前需充分振荡至分散均匀），使用移液器吹打至磁珠分散均匀；
4. 室温静置 10 min，放置过程中，使用移液器吹打混匀 2-3 次，保持磁珠处于悬浮状态；
5. 将离心管移至磁力架上静置 30 s，待上清清澈后，吸弃上清；
6. 加入 500 μ L Buffer PD，移开磁力架，使用移液器吹打至磁珠分散均匀，将离心管移至磁力架上静置 30 s，待上清清澈后，吸弃上清；
7. 加入 600 μ L Buffer PW，移开磁力架，使用移液器吹打至磁珠分散均匀，将离心管移至磁力架上静置 30 s，待上清清澈后，吸弃上清；
8. 重复步骤 7；
9. 将离心管盖打开，室温放置 5-10 min，使乙醇完全挥发（避免磁珠过度干燥，以免影响核酸得率）；
10. 移去磁力架，向离心管中加入 50-100 μ L Buffer TE 或 Nuclease-free Water，使用移液器轻轻吹打至磁珠分散均匀，室温静置 5 min；
11. 将离心管置于磁力架上，直至磁珠完全吸附，吸取上清至一新的 Nuclease-free 1.5 mL 离心管中，即得高纯度的 DNA。

(二) 分析沉淀所得 DNA（选用 RT-PCR 法或测序法）

1、RT-PCR 法

- 1.1、利用 JASPAR 等数据库预测转录因子结合位点，根据该结合位点设计引物并合成；
- 1.2、取 0.2ml PCR 管，配制如下反应体系：

2 \times qPCR Mix	10 μ l
2.5 μ M 基因引物	2 μ l
模板	2 μ l
ddH ₂ O	6 μ l

1.3、PCR 扩增

预变性	95 $^{\circ}$ C, 10min
循环（40 次）	95 $^{\circ}$ C, 15s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C, 60s
溶解曲线	60 $^{\circ}$ C \rightarrow 95 $^{\circ}$ C, 每 15s 升温 0.3 $^{\circ}$ C。

- 1.4、扩增结束后，取产物跑胶，检测片段大小是否正确。

2、测序法

收集所得 DNA，测序。

仅供科研用途，不可用于临床诊断！