

Reverse-ChIP试剂盒

Reverse-Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Kit

注:本产品干冰运输;试剂按说明书分别保存于4°C及-20°C,保质期12个月。

序号	试剂	货号及规格			储存
		IRP021 (6T)	IRP021M (12T)	IRP021L (40T)	
01	Glycine Buffer	36mL	72mL	144mL	4°C
02	Sucrose Buffer	12mL	24mL	48mL	4°C
03	RNase Buffer	6mL	12mL	24mL	4°C
04	Sonic Buffer	50mL	100mL	200mL	4°C
05	Agarose beads	0.36mL	0.72mL	1.44mL	4°C
06	Streptavidin beads	0.12 mL	0.24mL	0.48mL	4°C
07	10 mM Tris-HCl pH7.5	12mL	24mL	48mL	4°C
08	Protein Elution Buffer	0.36mL	0.72mL	1.44mL	4°C
09	DNA Elution Buffer	4.2mL	8.4mL	16.8mL	4°C
10	Glycogen	12μL	24μL	48μL	4°C
11	5M NaCl	0.3mL	0.6mL	1.2mL	4°C
12	ddH ₂ O	0.36mL	0.72mL	1.44mL	4°C
13	protease inhibitor	0.31mL	0.62mL	1.25mL	-20°C

14	DTT	0.31mL	0.62mL	1.25mL	-20°C
15	RNase A	0.02mL	0.05mL	0.1mL	-20°C
16	Proteinase K	0.1mL	0.19mL	0.38mL	-20°C

产品简介/Product Description

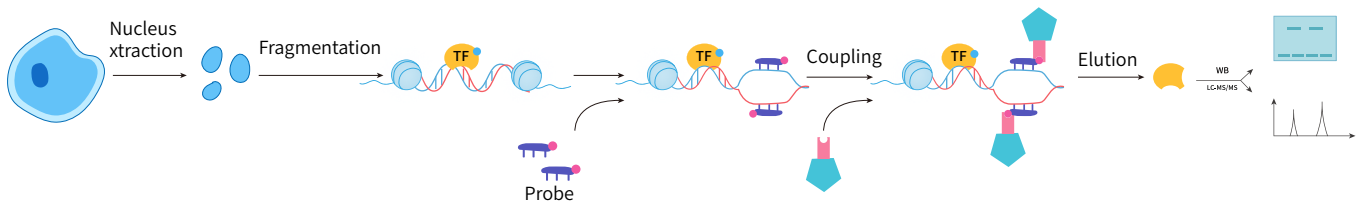
反向染色质免疫共沉淀技术 (reverse chromatin immunoprecipitation assay, Reverse ChIP) 相对应于染色质免疫共沉淀技术，是一种在体内状态下分析 DNA- 蛋白质相互作用的新方法。

它用特异的核酸探针捕获靶 DNA 片段及与其相结合的蛋白质，蛋白质用质谱仪或 western blot 检测，以确定靶 DNA 位点全部相关蛋白质。

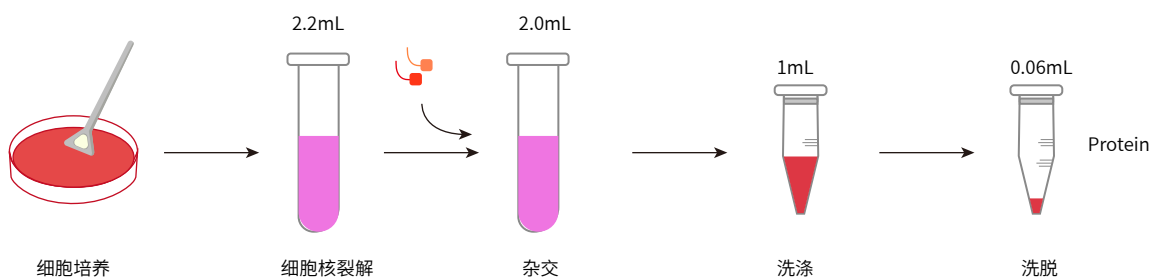
其可对靶 DNA 位点相关蛋白质进行全面、系统地鉴定，特别是寻找已知 DNA 元件相应的调节蛋白。在发现、鉴定靶 DNA 位点相关蛋白质和研究 DNA- 蛋白质相互作用中有重要应用价值。

技术路线/Technology mapping

1. 原理流程图



2. 实验操作流程



使用流程/Procedure

1. 探针设计

- ① 核酸序列数据库下载目标调控区域核苷酸序列；
- ② 每 200 bp 设计 1 条探针，探针间的间隔区域为 160~180 bp；
- ③ GC% 在 45% 左右；
- ④ 探针长度为 25 nt 左右；
- ⑤ 探针与启动子正义链或反义链序列互补，5 端或 3 端生物素标记。

2. 交联

细胞样本：

- ①胰酶消化细胞后 1000 rpm 离心 5 min 收集 1×10^8 细胞于 15 mL 离心管中；
- ②加入 10 mL $1 \times$ PBS 洗涤一次，1000 rpm，离心 5 分钟收集细胞；
- ③向管中加入 20 mL $1 \times$ PBS（含有 1.62 mL 37% 甲醛，甲醛终浓度 3%），垂直混匀器室温交联 10 min；
- ④向管中加入 6 mL 1.375 M Glycine（或 0.6 g Glycine），垂直混匀器室温中和 5 min；
- ⑤4°C，1500 rpm，离心 5 分钟收集细胞，弃上层 PBS 溶液；
- ⑥加入 10 mL 预冷的 $1 \times$ PBS，洗涤两次细胞，每次 4°C，1000 rpm 离心 5 分钟收集细胞。

组织样本：

- ①新鲜组织 1 g：使用剪刀充分剪碎至 1 mm³ 体积，2 mL $1 \times$ PBS 洗涤两次，每次 1000 rpm，离心 5 分钟收集沉淀，加入 20 mL $1 \times$ PBS（含有 1.62 mL 37% 甲醛，甲醛终浓度 3%），垂直混匀器室温交联 20 min；
深低温保存的冻存组织 1 g：直接用液氮研磨至均匀粗粉，2 mL $1 \times$ PBS 洗涤两次，每次 1000 rpm，离心 5 分钟收集沉淀，加入 20 mL $1 \times$ PBS（含有 1.62 mL 37% 甲醛，甲醛终浓度 3%），垂直混匀器室温交联 20 min；
深低温保存的冻存组织 1 g：直接用液氮研磨至均匀粗粉，2 mL $1 \times$ PBS 洗涤两次，每次 1000 rpm，离心 5 分钟收集沉淀，加入 20 mL $1 \times$ PBS（含有 1.62 mL 37% 甲醛，甲醛终浓度 3%），垂直混匀器室温交联 20 min；
- ②向管中加入 6 mL 1.375 M Glycine（或 0.6 g Glycine），垂直混匀器室温中和 5 min；
- ③4°C，1500 rpm，离心 5 分钟收集细胞，弃上层 PBS 溶液；
- ④加入 10 mL 预冷的 $1 \times$ PBS，洗涤两次组织，每次 4°C，1000 rpm 离心 5 分钟收集组织；
- ⑤匀浆器冰上充分匀浆组织，用 100 μ m 过滤收集细胞悬液，可加少量 $1 \times$ PBS 冲洗；
- ⑥1500 rpm、4°C 离心 5 分钟，弃上清，收集细胞。

3. 制备细胞核

加入预冷的 2 mL Sucrose Buffer, 20 μ L protease inhibitor, 20 μ L DTT 充分悬浮沉淀后，转移至严密匀浆器，充分匀浆 20 次后，4°C，2500 g 离心 5 min，弃上清。

4. 消化 RNA

- ①细胞核沉淀中加入 1 mL RNase Buffer, 10 μ L protease inhibitor, 10 μ L DTT, 4 μ L RNase A 并充分悬浮，室温摇动孵育消化 RNA 1 h；
- ②4°C，2500 g 离心 5 min 弃上清，加入预冷的 1 mL $1 \times$ PBS 充分悬浮沉淀后，4°C, 2500 g 离心 5 min 弃上清，并重复洗涤一次。

5. 染色质片段化

- ①加入 2.2 mL Sonic Buffer, 22 μ L protease inhibitor, 22 μ L DTT 冰上 2 s ON、5 s OFF、230W 超声破碎 20 min，超声破碎染色质经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测至片段大小为 500~1000 bp 范围；
- ② 4°C，15000 g 离心 15 min 转移上清至新离心管中；
- ③按照 2.0 mL、0.1 mL 及 0.1 mL 比例分配样品，分别标示为 reverse-ChIP、Input Protein、Input DNA（选做）。
- ④Input Protein 样品 -20°C 暂存，Input DNA 样品直接开展 DNA 提取步骤（选做）。

6. 预洗涤

Reverse-ChIP 组样品加入 60 μ L Agarose beads 室温摇动孵育 1 h，室温 4000 g 离心 1 min，转移上清至新离心管中。

7. 探针准备

- ①探针组第一条加入 100 倍 nmol 数 μ L $1 \times$ TE，充分涡旋混匀后微离心后转移到第二管，以此类推溶解探针组，每条探针浓度为 10 pmol/ μ L（探针组母液）；
- ②取 5 μ L 探针组母液，加入 495 μ L $1 \times$ TE 充分涡旋混匀，探针组每条探针浓度为 0.1 pmol/ μ L（探针组工作液）；

- ③按 1 μ L 探针组 / 1×10^8 细胞比例 (即 0.1 pmol 探针 / 条 / 1×10^8 细胞, 探针总量为 $n \times 0.1$ pmol, 取 Reverse-ChIP 组探针组溶液 1 μ L;
- ④85°C 变性 3 分钟后, 快速转移冰浴。

8. 杂交捕获

- ①Reverse-ChIP 组染色质超声破碎样品中加入预变性的探针组;
- ②垂直混匀器上 85°C 温育变性 10 min, 37°C 杂交 30 min; 70°C 温育变性 5 min, 37°C 杂交 30 min; 55°C 温育变性 2.5 min, 37°C 杂交 60 min 杂交样品;
- ③样品中加入步骤 9 中的 Streptavidin beads 充分混匀后, 室温垂直混匀器上温育结合 90 min; 4 磁力架收集磁珠并去上清。

9. 磁珠准备

- ①当杂交捕获进行到步骤②时, 为 Reverse-ChIP 组准备 20 μ L Streptavidin beads 磁珠, 磁力架收集磁珠并去上清;
- ②加入 1 mL 10 mM Tris-HCl pH7.5 充分重悬后, 颠倒混匀 10 次, 磁力架收集磁珠并去上清, 重复 1 次;
- ③加入 0.2 mL Sonic Buffer 充分重悬后, 颠倒混匀 10 次, 待用, 用时磁力架收集磁珠并去上清。

10. 洗涤

- ①Reverse-ChIP 组磁珠中分别加入 1 mL Sonic Buffer 颠倒混匀充分悬浮后, 磁力架上静置收集 1 min 弃上清, 并重复操作 2 次;
- ②Reverse-ChIP 组磁珠加入 42°C 预热的 1 mL Sonic Buffer 颠倒混匀充分悬浮后, 42°C 摇动洗涤 5 min, 磁力架上静置收集 1 min 弃上清, 并重复操作 1 次;
- ③Reverse-ChIP 组磁珠再次加入 42°C 预热的 1 mL Sonic Buffer 颠倒混匀充分悬浮后转移 50 μ L 混合液到新离心管中, 并标示为 Reverse-ChIP DNA, 直接进行步骤 13,14, 原管标示为 Reverse-ChIP Protein, 直接进行步骤 11,12。

11. 洗脱蛋白质

- ①Reverse-ChIP Protein 组在磁力架上静置 1 min, 去除上清;
- ②磁珠样品中加入 60 μ L Protein Elution Buffer, 100°C 水浴加热 10 min, 加热的过程中不断摇动以避免磁珠沉淀;
- ③磁力架上静置收集 1 min 转移上清至新的离心管中; 4 蛋白质样品可置于 -80°C 保存备用。

12. 蛋白质定性定量分析

- ①取 15 μ L 蛋白样品开展 PAGE- 银染检测;
- ②取 15 μ L 蛋白样品开展 PAGE western blot 检测 (选做);
- ③取 30 μ L 蛋白样品开展 LC-MS 检测;
- ④剩余样品 -20°C 保存备用;

注意: 1. LC-MS 需要蛋白总量 ≥ 100 ng;

2. β -actin、GAPDH 均可作为 western blot 阴性对照;

13. DNA 提取

- ①Reverse-ChIP DNA 样品在磁力架收集磁珠并去上清, 加入 200 μ L DNA Elution Buffer、8 μ L Proteinase K 充分重悬; Input DNA 样品加入 300 μ L DNA Elution Buffer、8 μ L Proteinase K;
- ②55°C 温育消化 60 min, 期间摇动混匀;
- ③磁力架收集磁珠, 转移上清到新离心管中; 含有磁珠的离心管重复加入 200 μ L DNA Elution Buffer, 65°C 水浴洗脱 15 min, 期间摇动混匀, 磁力架收集磁珠, 转移上清到对应新离心管中 (每管共 200+200 μ L);
- ④加入 400 μ L 苯酚 - 氯仿 - 异戊醇混合液 (25:24:1) 充分颠倒混匀后, 室温 13000 g 离心 10 分钟后, 取上清;
- ⑤加入 800 μ L 无水乙醇、1 μ L Glycogen、25 μ L 5 M NaCl, 充分颠倒混匀后 -20°C 沉淀沉淀 2 小时或过夜;

- ⑥4°C, 16100 g 离心 30 min, 去上清;
- ⑦预冷的 75% 乙醇洗涤一次, 4°C, 16100 g 离心 30 min, 去上清;
- ⑧静置晾干 10 分钟;
- ⑨每管加入 30 μ L ddH₂O, 37°C 温育溶解 10 分钟, 样品 -20°C 保存备用。

14. 引物设计及 qPCR 定量分析

- ①核酸序列数据库检测目标调控区域核苷酸序列;
- ②设计 qPCR 引物, 特性性高, 产物长度为 100~250 bp 范围;
- ③参考 2 \times SYBR Green qPCR Mix 试剂盒说明书配置 20 μ L PCR 扩增体系进行 qPCR, 然后进行数据分析, 得到富集效率。

注意事项/Notes

- 1. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内;
- 2. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

