

3C试剂盒

Chromosome Conformation Capture (3C) 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
		IEP0012 (25T)	IEP0012M (50T)	IEP0012L (100T)	
01	Glycine	6 mL	12 mL	24 mL	4°C
02	Lysis buffer	3 mL	6 mL	12 mL	4°C
03	Buffer 1	0.54 mL	1.08 mL	2.16 mL	4°C
04	Buffer 2	4.8 mL	9.6 mL	19.2 mL	4°C
05	NaAc	4.8 mL	9.6 mL	19.2 mL	4°C
06	Protease inhibitor	30 μL	60 μL	120 μL	-20°C
07	10×T4 ligation buffer	4.5 mL	9 mL	18 mL	-20°C
08	Buffer 3	0.45 mL	0.9 mL	1.8 mL	-20°C
09	Buffer 4	0.45 mL	0.9 mL	1.8 mL	-20°C
10	T4 DNA Ligase	18 μL	36 μL	72 μL	-20°C
11	Proteinase K	0.12 mL	0.24 mL	0.48 mL	-20°C
12	RNase A	0.12 mL	0.24 mL	0.48 mL	-20°C
13	2×PCR Mix	0.48 mL	0.96 mL	1.92 mL	-20°C

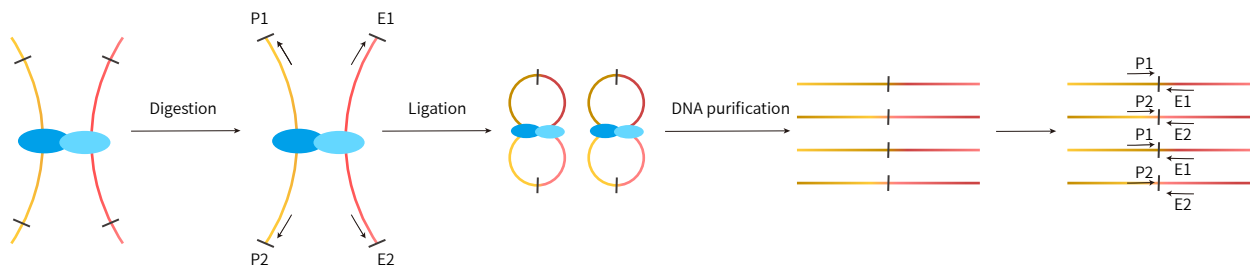
产品简介/Product Description

染色体构象捕获技术 (chromosome conformation capture, 3C), 是革新性的绘制染色质相互作用的工具, 应用于酵母中研究基因表达时, 染色质的空间构象分析, 继而发展为在后动物中研究细胞内染色质间的相互作用;

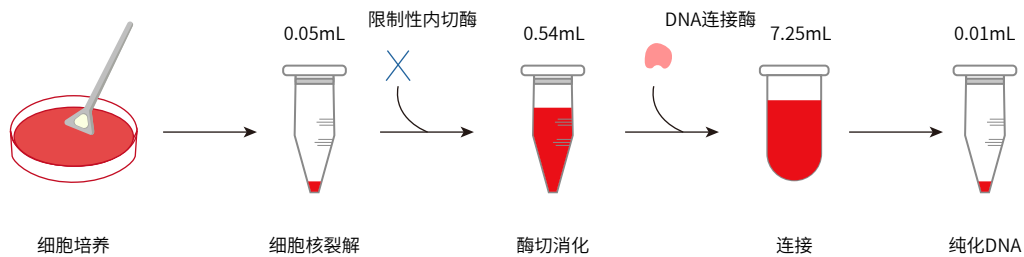
3C 技术, 能从全基因组的角度诠释了蛋白质因子与染色质相互作用的关系, 以及细胞核内互作染色质的空间构象。

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. 限制性内切酶的选择和引物设计

①根据启动子与增强子序列, 综合选择合适的限制性内切酶 X 将启动子与增强子切成多个片段, 保证启动子和增强子两端被切开, 应避免产生大 (大于 10kb) 或小 (小于 1kb) 限制性片段的酶, 因为非常大和非常小的片段分别导致频率略高和较低。这对于涉及顺式 (循环) 相互作用的研究尤其重要;

②根据启动子与增强子酶切位点针对扩增的限制性酶位点附近设计上下游引物。

注意:

1. 选择酶切位点没有简并碱基的限制性内切酶 X;
2. 如需进行酶切酶连和引物验证, 方法参照附件。

2. 交联

(1) 细胞样本

- ①胰酶消化获得 1×10^7 细胞，1 mL $1 \times$ PBS 洗涤两次，每次 1000 rpm，离心 5 min 收集细胞；
- ②转入 15 mL 离心管，加入 10 mL $1 \times$ PBS 重悬细胞；
- ③加入 270 μ L 37% 甲醛（27 μ L/mL $1 \times$ PBS 比例，甲醛终浓度 1%），垂直混匀器室温交联 10 min；
- ④加入 1 mL 1.375 M Glycine（或 0.1 g Glycine），垂直混匀器室温中和 5 min；
- ⑤4 $^{\circ}$ C，4000 rpm，离心 5 min 收集细胞，弃上层 PBS 溶液；
- ⑥加 1 mL 预冷的 $1 \times$ PBS，转移至新的 EP 管，洗涤两次细胞，每次 4 $^{\circ}$ C，2000 rpm 离心 5 min 收集细胞。

(1) 组织样本

- ①新鲜组织或深低温保存的冻存组织，使用剪刀充分剪碎至 1 mm³ 体积，加入 10 mL PBS；
- ②加入 270 μ L 37% 甲醛（27 μ L/mL $1 \times$ PBS 比例，甲醛终浓度 1%），垂直混匀器室温交联 20 min；
- ③加入 1 mL 1.375 M Glycine（或 0.1 g Glycine），垂直混匀器室温中和 5 min，结束后置于冰上 15 min；
- ④匀浆器冰上充分匀浆组织 15-20 次；
- ⑤4 $^{\circ}$ C，4000 rpm，离心 5 min 收集细胞，弃上层 PBS 溶液；
- ⑥加 1 mL 预冷的 $1 \times$ PBS，转移至新的 EP 管，洗涤两次细胞，每次 4 $^{\circ}$ C，1000 rpm 离心 5 min 收集细胞。

3. 细胞核制备

- ① 1×10^7 交联的细胞在 0.5 mL Lysis Buffer、5 μ L Protease inhibitor 中，冰上孵育 15 min；
- ②匀浆器在冰上匀浆 20 次破碎细胞（或涡旋 5 次，每次 30 s，间隔 3 min）；
- ③细胞悬液转移至新 EP 管，室温下 2000 g 离心 5 min；
- ④去上清，加 100 μ L $1 \times$ restriction enzyme buffer，轻吹混匀。室温下 2000 g 离心 5 min；
- ⑤重复步骤④一次；
- ⑥去上清，将沉淀颗粒重新悬浮在 50 μ L $1 \times$ restriction enzyme buffer，进行后续实验。

注意：

1. 样品经液氮速冻，-80 $^{\circ}$ C 保存或进行后续实验；
2. restriction enzyme buffer 为限制性内切酶配套的 buffer。

4. 酶切消化

- ①加入 337 μ L $1 \times$ restriction enzyme buffer，轻吹混匀；
- ②加入 4 μ L Buffer 1，轻吹混匀，65 $^{\circ}$ C 水浴 10 min；
- ③加入 44 μ L Buffer 2，轻吹混匀，避免产生气泡；
- ④加入 200U 的限制性内切酶 X，轻吹混匀，37 $^{\circ}$ C 水浴过夜消化；
- ⑤加入 86 μ L Buffer 1，轻吹混匀；
- ⑥在 65 $^{\circ}$ C 下水浴孵育 30 min 以灭活该酶。

注意：不同酶灭活温度时间参考其说明书。

5. 连接

- ①将每个反应（约 541 μ L）分别转移到 15 mL 锥形试管中。配制以下连接反应：

组分	体积 (μ L)
酶切消化产物	541
$10 \times$ T4 ligation buffer	750
Buffer 2	750

Buffer 3	75
Buffer 4	75
T4 DNA Ligase	3
ddH ₂ O	补齐至7.5 mL

②在 16°C下旋转孵育 2 h。

6. DNA 提取

- ①样品加入 20 μL Proteinase K, 65°C水浴孵育过夜;
- ②加入 20 μL RNase A 37°C水浴 30 min;
- ③将每个上述反应转移到 50 mL 锥形离心管中;
- ④每管加入 7.5 mL 苯酚 / 氯仿 (苯酚 : 氯仿 =1:1), 涡旋 2 min, 1500 g 离心 10 min;
- ⑤将水相 (上层) 转移到新鲜的 50 mL 锥形试管中;
- ⑥加入 0.1 体积 (~750μL) 的 3M NaAc;
- ⑦加入 2.5 体积的冷无水乙醇, 颠倒混匀, 在 -80°C下放置至少 2 h (可过夜);
- ⑧6,000 g, 4°C, 离心 20 min;
- ⑨去掉上清液, 将每个沉淀颗粒重新悬浮在 500 μL ddH₂O;
- ⑩将 500 μL 液体转移到一个 1.5 mL 的离心管中;
- ⑪加入 500 μL 苯酚 / 氯仿 (苯酚 : 氯仿 =1:1), 涡旋 1 min, 13,000g, 离心 5 min;
- ⑫将水相 (上层) 转移到 1.5 mL 的新的离心管中, 不要用吸管尖头触摸接口;
- ⑬加入 0.1 体积 (~50 μL) 的 3M NaAc;
- ⑭加入 2.5 体积的冷无水乙醇, 轻轻搅拌, 在 -80°C下放置至少 2 h (可过夜);
- ⑮16,000 g, 4°C, 离心 30 min;
- ⑯去掉上清液, 将颗粒重新悬浮在 1 mL 80% 乙醇中洗涤, 在 4°C, 16,000 g, 离心 15 min;
- ⑰将颗粒重新悬浮在 500 μL ddH₂O, 得到的为 3C 产物, 应保存在 -20 °C下。

注意:

1. 暂停点: 3C 产物可在 -20°C下存储至少 1 年;
2. 如果 DNA 浓度远低于预期, 我们建议再次沉淀 DNA 产物并将其以较小体积重新悬浮。DNA 应在重新沉淀后用 80% 乙醇彻底洗涤几次。

7. 3C 产物 PCR

- ①3C 产物的 PCR 体系, 通常用聚合酶链式反应检测 1 组 3C DNA 产物和 1 组水对照;
- ②20 μL 反应体系如下:

试剂	体积(μL)
3C DNA 产物	1
2×PCR Mix	10
10 μM PCR primer 1	1
10 μM PCR primer 2	1

ddH ₂ O	7
--------------------	---

③扩增反应程序为：94℃预变性 5 min；35 cycles，94℃变性 20 s、60℃退火 20 s、72℃延伸 10 s；72℃扩增 15 min；4℃ hold；

④每个 PCR 样品在 3% 的琼脂糖凝胶上跑胶；

⑤使用凝胶记录系统对聚合酶链式反应产物进行量化；

⑥如果 PCR 产物跑胶时有正确大小的条带。此时将正确大小的条带进行切胶回收（增大扩增体系得到足够测序的量），送测序，以自身引物测序，测出接头位置，如果测序结果为启动子 + 增强子，则证明这个增强子片段与这个启动子片段之间有相互作用。

注意：

1. 每 1 T 的 3C 酶切连接反应产物配备 80 μL 的 2×PCR Mix，如需重复 PCR，需额外自备；

2. 扩增反应程序根据 PCR Mix 进行调整。

附件 (选做) : 酶切酶连和引物验证操作步骤 (所需试剂需额外准备)

1. DNA 提取

①取 5×10^6 细胞沉淀；

②使用 DNA 提取试剂盒，提取总 DNA。

注意：自备 DNA 提取试剂盒。

2. PCR 扩增与纯化

①配制反应体系 (50 μL)：

试剂	体积 (μL)
DNA模板	2
2×PCR Mix	25
10 μM Forward Primer	2
10 μM Reverse Primer	2
ddH ₂ O	19

②进行 PCR 反应：94℃预变性 5 min；35 cycles，94℃变性 20 s、60℃退火 20 s、72℃延伸 30 s；72℃扩增 15 min；4℃ hold；

③-20℃保存 PCR 产物待进行琼脂糖凝胶电泳；

④通过切胶，胶回收试剂盒回收 DNA，NanoDrop 检测 DNA 浓度；

注意：

1. Forward Primer、Reverse Primer 为启动子和增强子序列内每个限制性酶切位点两端的引物；

2. 自备胶回收试剂盒。

3. 酶片段化

①等分子量混合已经纯化好的扩增片段作为 DNA 模板；

②酶切体系：模板总质量 1 μg，1 μL 限制性内切酶 X，3 μL 10×restriction enzyme buffer，ddH₂O 补充到 30 μL。反应条件：37°C、2 h；

③终止酶切：反应条件 65°C、20 min。

4. 连接

①配制酶连接反应体系（40 μL）：

试剂	体积 (μL)
酶切产物	30
T4 DNA Ligase	4
10×T4 ligation buffer	4
ddH ₂ O	2

5. DNA 纯化

①将 40 μL 连接产物加 60 μL ddH₂O 补充到 100 μL；

②加入 100 μL 苯酚 / 氯仿（苯酚：氯仿 = 1:1）混合液到样品中，颠倒混匀 15 s；

③13,000 g，4°C离心 10 min，收集上层水相（~100 μL），转移到新的离心管中；

④加入 250 μL 无水乙醇充分颠倒混匀；

⑤-80°C静置 3 h~ 过夜沉淀 DNA 样品；

⑥4°C，16,000 g 离心 30 min，弃上清；

⑦加入 500 μL 预冷的 80% 乙醇，4°C，16,000 g 离心 10 min，弃上清，室温静置风干 10 min；

⑧加入 40 μL ddH₂O 溶解 DNA，-20°C保存。

6. PCR

①根据启动子与增强子酶切位点，针对每段序列设计近酶切位点引物（正反向二选一）；

②启动子引物与增强子分别配对 PCR。

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。

