

组织染色质免疫共沉淀 (ChIP) 试剂盒

产品货号: BA2464

产品规格: 20T

产品简介:

染色质免疫沉淀技术 (chromatin immunoprecipitation assay, ChIP) 作为最佳的研究体内DNA与蛋白质相互作用的方法, 它的基本原理是在活细胞状态下固定蛋白质-DNA复合物, 并将其随机切断为一定长度范围内的染色质小片段, 然后通过免疫学方法沉淀此复合物, 特异性地富集目的蛋白结合的DNA片段, 通过对目的片段的纯化与检测, 从而获得蛋白质与DNA相互作用的信息。

产品组成:

| 产品名称 | 20T | 保存条件 |
|-----------------------|-------|------|
| 1M 甘氨酸 | 26ml | 2-8℃ |
| 蛋白酶抑制剂 | 300μl | -20℃ |
| Buffer A | 20ml | 2-8℃ |
| Buffer B | 10ml | 2-8℃ |
| Chip Dilution Buffer | 24ml | 2-8℃ |
| ProteinA+G beads | 2.4ml | 2-8℃ |
| RNA Polymerase II抗体 | 40μl | -20℃ |
| 正常血清 IgG | 40μl | -20℃ |
| Low Salt Wash Buffer | 20ml | 2-8℃ |
| High Salt Wash Buffer | 20ml | 2-8℃ |
| LiCl Wash Buffer | 20ml | 2-8℃ |
| TE Buffer | 40ml | 2-8℃ |
| RNaseA | 20μl | -20℃ |
| Proteinase K | 20μl | -20℃ |
| 阳性对照引物 | 20μl | -20℃ |

操作步骤:

1. 称取新鲜的组织或冰冻的组织, 用振动切片机将组织切成1-3mm小块。
2. 转移组织至50ml离心管中, 用预冷的PBS清洗3次, 去除PBS, 加培养液 (1640) 至9ml。
3. 加入243μl 37%甲醛, 使得甲醛终浓度为1%, 室温摇床10min。
4. 终止交联: 加1M甘氨酸1.26ml, 使其终浓度为0.125M, 室温摇床5min。
5. 吸尽培养基, 用预冷的PBS洗两次后, 加适量蛋白酶抑制剂 (2ml PBS中加入5μl蛋白酶抑制剂), 用玻璃匀浆器将组织磨碎, 形成单细胞悬液, 2000rpm, 4℃离心5min。
6. 弃上清, 加入1ml Buffer A, 冰上放置10min, 3000-5000rpm离心5min。
7. 弃上清, 加入400 Buffer B (每100 Buffer B中含有10⁶细胞) 重悬后加入5μl 蛋白酶抑制剂。
8. 超声破碎。一般来说, 300W超声15s, 间隔45s, 13次。12000rpm, 4℃离心20min。取20μl上清进行步骤19-23之后再行电泳检测, 抹带集中在500-1000bp左右即可。
9. 样品分成三组, 每组100μl, A: 实验组; B: 阳性对照组; C: 阴性对照组, 剩余样品可放置-80℃保存。
10. 在三组样品中分别加入900μl Chip Dilution Buffer。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

11. 准备ProteinA beads, 用1ml PBS清洗三次(3000rpm离心1min)后保存备用, 此步可提前准备。
12. 三组样品中各加入60 μ l ProteinA beads, 4 $^{\circ}$ C颠倒混匀1-2h。
13. 混匀后4 $^{\circ}$ C静置10min, 3000rpm离心1min。
14. 取上清, 每组样品取20 μ l进行Input实验, -20 $^{\circ}$ C保存。
15. 实验组中加入1-10 μ g抗体; 阳性对照组加入1 μ g RNA Polymerase II抗体; 阴性对照组加入1 μ l正常血清IgG, 4 $^{\circ}$ C过夜孵育。
16. 三组样品中再加入60 μ l ProteinA beads, 4 $^{\circ}$ C颠倒混匀1-2h。
17. 洗涤ProteinA beads, 依次用下列溶液清洗沉淀复合物。清洗步骤为: 加入1ml预冷溶液, 在4 $^{\circ}$ C混匀10min, 3000rpm离心1min, 除去上清。
 - a. Low Salt Wash Buffer, 1次。
 - b. High Salt Wash Buffer, 1次。
 - c. LiCl Wash Buffer, 1次。
 - d. TE Buffer, 2次。
18. 每管加入100 μ l Elution Buffer (100 μ l10%SDS+100 μ l1M NaHCO₃+800 μ l ddH₂O), 室温颠转10min后3000rpm离心1min, 收集上清。重复洗脱1次, 终体积200 μ l。
19. 取出Input实验样品, 室温融化后加入180 μ l Elution Buffer。
20. 解交联。每管中加入8 μ l 5M NaCl, 混匀, 65 $^{\circ}$ C解交联过夜。
21. 解交联结束后, 每管加入1 μ l RNaseA, 37 $^{\circ}$ C孵育1h。
22. 每管加入4 μ l 0.5M EDTA, 8 μ l 1M Tris-HCl (PH=6.5), 1 μ l Proteinase K, 45 $^{\circ}$ C孵育2h。
23. DNA片段回收(PCR纯化试剂盒)。
24. 对照品的PCR。
25. 取出每种PCR反应物10 μ l, 采用4%琼脂糖凝胶电泳(采用100bp DNA marker)进行分析。

注意事项:

1. 甲醛固定时, 时间不宜过长, 10min即可。
2. 超声时温度不能过高, 最好冰浴进行; 防止样品起沫。
3. 样品中加入填料后离心转数不能过大, 防止填料破碎。
4. 蛋白酶抑制剂使用前室温融化。

保存: -20 $^{\circ}$ C保存, 有效期12个月。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司
Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com