

ab500 – CHIP 试剂盒

使用说明书

用于定位基因组的修饰位点

本产品仅供研究使用，不得用于诊断。

最新版本请参考官网英文说明书。

版本 12 最新修订于：2021 年 8 月 25 日

目录

前言

- 1. 背景 2
- 2. 检测流程概览 2

一般信息

- 3. 注意事项 3
- 4. 保存和稳定性 3
- 5. 试剂盒提供的材料 4
- 6. 试剂盒未提供的其他材料 5
- 7. 局限性 5
- 8. 技术提示 6

检测准备工作

- 9. 试剂准备 7
- 10. 样本准备 7

检测步骤

- 11. 检测步骤 12

数据分析

- 12. 分析 18

相关资料

- 13. 疑难解答 19
- 14. 备注 21

1. 背景

ChIP（染色质免疫沉淀）是一种在体研究蛋白质 -DNA 相互作用的强大技术。ChIP 的原理很简单：选择性地富集含有特异性蛋白的染色质片段，可测定该蛋白在基因组一个或多个位点的相对丰度。因此，ChIP 是识别目标基因组修饰位点的便捷手段。此外，ChIP 与微阵列检测技术结合使用，可以进一步研究并确定蛋白质 - DNA 的结合形式。

ab500 ChIP 试剂盒可用于定位基因组特异性位点上的目标蛋白质/组蛋白修饰。抗体和蛋白质 A 磁珠可用于免疫沉淀染色质/DNA 复合物。随后，用定量 PCR 量化目标 DNA。

2. 检测流程概览



3. 注意事项

开始检测前，请仔细阅读以下说明。

试剂盒的所有组分均已经过配制和质量控制检测，可用于检测。对试剂盒组分或试验步骤进行修改可能导致性能受损。

4. 保存和稳定性

收到试剂盒后，按照表格所示条件保存试剂盒。

遵守第 9 节和第 10 节关于各独立组分的储存条件。

为使产品获得最大回收效率，请在开盖前离心原始小瓶。

5. 试剂盒提供的材料

Item	24 Tests	Storage Condition (Before Preparation)
Buffer A	10 mL	4 °C
1.25M Glycine	10 mL	4 °C
Buffer B (Lysis)	30 mL	4 °C
Buffer C (Lysis)	30 mL	4 °C
Buffer D (Chromatin Shearing)	3 mL	4 °C
5x ChIP Buffer	84 mL	4 °C
Protease Inhibitor	1 tablet	-20 °C
DNA purifying slurry	4 mL	4 °C
Proteinase K	40 µL	-20 °C
unblocked Protein A beads	960 µL	4 °C
PCR-grade H ₂ O	10.2 mL	4 °C
Positive control (ab1791 Histone H3 antibody)	25 µg	-20 °C

6. 试剂盒未提供的其他材料

进行本检测还需要使用这些试剂盒中未提供的材料：

注：本ChIP试剂盒不含引物。

- 胰蛋白酶（使用前预热至 37 °C）
- 细胞培养基（使用前预热至 37 °C）
- PBS（使用前预冷）
- 甲醛（使用前预热至 37 °C）
- 加热块
- 1.5% 琼脂糖凝胶
- 台式离心机（最高转速 14,000 rpm）
- 超声波破碎仪
- 旋转混匀仪
- 移液器及移液器吸头
- 1.5 mL 微量离心管
- 15 mL 锥形离心管

7. 局限性

- 检测试剂盒仅供研究使用。不能用于诊断
- 如果超过试剂盒标签上的有效期，请勿使用试剂盒或组分
- 请勿将其他试剂盒批次或其他供应商的试剂与本试剂盒混用，或代替本试剂盒的试剂或材料。本试剂盒是以一整套组分进行质量控制检测的，如果试剂盒组分被分开使用或被其他试剂替代，则无法保证性能
- 操作人员、移液技术、洗涤技术、孵育时间或温度，以及试剂盒寿命的差异均可导致结合力变化

8. 技术提示

- 混合或复溶组分时，应避免产生泡沫或气泡。
- 在每次加入样本、标准品和试剂的操作之间要更换吸头，以避免样本或试剂的交叉污染。
- 在孵育步骤中，确保微孔板完全密封或加盖。
- 在洗涤步骤期间完全移除所有溶液和缓冲液。
- **该试剂盒根据检测次数销售，一次“检测”指一个检测孔的分析。不同产品所含有的样本、对照品或标准品的孔数不同。请彻底检查实验方案，并确认该试剂盒符合您的要求。如有任何问题，请联系我们的技术支持人员。**

9. 试剂准备

临用前准备新鲜试剂。

9.1 缓冲液 C

预冷。

9.2 缓冲液 D

室温，以确保无 SDS 沉淀。

9.3 1X CHIP 缓冲液

用 PCR 级 H₂O 将 5x CHIP 缓冲液稀释至 1X。

9.4 蛋白 A 凝胶琼脂糖珠

微珠需膨胀后使用。用 1 mL 预冷的 PBS 洗涤微珠两次，在微量离心机上短暂脉冲离心（14,000 rpm、5 秒）后，用 1 mL 1X CHIP 缓冲液重悬微珠。重悬后的微珠可以当日使用，也可以在 4°C 下保存最多一周。

9.5 25X 蛋白酶抑制剂溶液

在 400 μ L 水中溶解蛋白酶抑制剂（PI）片剂，制备成 25X 蛋白酶抑制剂溶液。分装保存于 -20°C，避免反复冻融。

10. 样本准备

10.1 细胞固定及收集

3 次 CHIP 检测最少需要 3×10^6 个细胞。样本在免疫沉淀阶段分成 3 份（第 11.1.3 节）。为了处理更多细胞，需相应改变体积。详情可见相关列表。

10.1.1 用胰蛋白酶处理细胞。例如，用 10 mL PBS 洗涤细胞，在 92 cm² 培养皿中加入 1 mL 胰蛋白酶，在 37°C 下孵育 5 分钟，通过多次移液加入 4 mL 培养液，停止反应，生成单细胞悬液。在此阶段，可以进行细胞计数。用离心管分装最少 3×10^6 个细胞。

检测准备工作

10.1.2 离心沉淀细胞（10 分钟，500 g，室温），弃上清液。

10.1.3 用 1 mL PBS 洗涤细胞并离心沉淀（10 分钟，500 g，室温）。

10.1.4 按照下表说明，用缓冲液 A/福尔马林/PBS 混合液重悬细胞。请注意，福尔马林的最终浓度约为 1.1%。

Cell Number	No. CHIP reactions	Buffer A (μL)	Formaldehyde (μL)	PBS (mL)
3 x 10⁶	3	45	20	0.6
6 x 10⁶	6	90	40	1.2
10 x 10⁶	10	150	67	2.0
15 x 10⁶	15	225	100	3.0
24 x 10⁶	24	360	161	4.8

10.1.5 轻柔混匀并在室温下孵育 10 分钟。

10.1.6 按照下表说明，加入甘氨酸封闭福尔马林并混匀。

Cell Number	Glycine (μL)
3 x 10⁶	65
6 x 10⁶	130
10 x 10⁶	210
15 x 10⁶	315
24 x 10⁶	504

10.1.7 离心沉淀细胞（5 分钟，500 g，4°C）。

10.1.8 用 1 mL 预冷的 PBS 洗涤细胞。离心沉淀细胞（5 分钟，500 g，4°C）。

10.2 细胞裂解与超声

10.2.1 按照下表说明，用缓冲液 B 重悬细胞。

Cell Number	Buffer B (mL)
3 x 10⁶	1.0
6 x 10⁶	2.0
10 x 10⁶	3.3
15 x 10⁶	5.0
24 x 10⁶	7.9

10.2.2 轻柔混匀并在室温下孵育 10 分钟。

10.2.3 离心沉淀样品（5 分钟，500 g，4°C）。弃上清液。

10.2.4 按照下表说明，用适量冰冷的缓冲液 C 重悬沉淀。

Cell Number	Buffer C (mL)
3 x 10⁶	1.0
6 x 10⁶	2.0
10 x 10⁶	3.3
15 x 10⁶	5.0
24 x 10⁶	7.9

10.2.5 轻柔混匀并在 4°C 下孵育 10 分钟。

10.2.6 离心沉淀样品（5 分钟，500 g，4°C），弃上清液。

10.2.7 按照下表说明，制备缓冲液 D/PI 混合液（25X）。

Cell Number	No. ChIP reactions	Buffer D (μL)	25X PI Mix (μL)	Total (μL)
3 x 10 ⁶	3	96	4	100
6 x 10 ⁶	6	192	8	200
10 x 10 ⁶	10	320	13	333
15 x 10 ⁶	15	480	20	500
24 x 10 ⁶	24	768	31	800

10.2.8 在步骤 10.2.6 制备的沉淀中加入 100 μL 缓冲液 D/PI 混合液。

10.2.9 用超声波破碎仪将 DNA 剪切成大小为 200 - 1000 bp 的片段。确保样品在整个超声处理过程中保持冰冷状态。

10.2.10 离心沉淀细胞碎片（5 分钟，14000 g，4°C）。上清液含剪切过的染色质，应置于冰上。

免疫沉淀（IP）之前，需先进行超声处理时程研究，以确定获得理想片段大小的最佳条件。

注：超声处理时间过长会破坏核小体 - DNA 相互作用，因此条带大小应不小于 200 bp。

10.3 测定 DNA 片段长度

10.3.1 在 20 μL 超声处理过的染色质中加入 100 μL PCR 级 H₂O。

10.3.2 倒转混匀 DNA 纯化悬液，并在超声处理过的染色质/H₂O 混合液中加入 100 μL 悬液。

10.3.3 倒转混匀样本并在 98°C 下孵育 10 分钟。

10.3.4 孵育后，室温放置 20 分钟冷却。

10.3.5 以 10000 g 的离心力短暂离心 10 秒，除去离心管盖上凝结的液体。

- 10.3.6 加入 1 μL 蛋白酶 K。以中等涡旋力涡旋混匀 5 秒。
- 10.3.7 在 55°C 下孵育样本 30 分钟。
- 10.3.8 在 98°C 下孵育样本 10 分钟。
- 10.3.9 离心沉淀 DNA 纯化悬液（1 分钟，14000 g，室温）。
- 10.3.10 吸出上清液并转移到 1.5 mL 离心管，注意不要吹打沉淀。
- 10.3.11 在 1.5 % 琼脂糖凝胶上加载 10 μL 样品，以分析 DNA 片段大小。

检测步骤

11. 检测步骤

11.1 免疫沉淀

11.1.1 用 PCR 级 H₂O 将 5X ChIP 缓冲液稀释至 1X，并按下表说明加入 PI 混合液（25X）。

Cell Number	No. ChIP reactions	5x ChIP Buffer (μL)	H ₂ O (mL)	25X PI Mix (μL)
3 x 10 ⁶	3	170	0.65	34
6 x 10 ⁶	6	340	1.29	68
10 x 10 ⁶	10	567	2.15	113
15 x 10 ⁶	15	850	3.23	170
24 x 10 ⁶	24	1361	5.16	271

11.1.2 按照下表说明，在剪切后的染色质中加入 1X ChIP 缓冲液/PI 混合液。涡旋混匀 5 秒。

Cell Number	No. ChIP reactions	1x ChIP Buffer/PI (mL)	Sheared Chromatin (μL)
3 x 10 ⁶	3	0.83	100
6 x 10 ⁶	6	1.65	200
10 x 10 ⁶	10	2.75	333
15 x 10 ⁶	15	4.12	500
24 x 10 ⁶	24	6.6	799

11.1.3 对每次 ChIP 检测，需将 280 μL 经步骤 11.1.2 稀释的染色质分装入 1.5 mL 离心管内。冻存剩余染色质，以备按照步骤 11.3.2 制备 INPUT 时使用。除非另有说明，凡在实验方案这一步提到体积，均为 1 × 10⁶ 个细胞/每次 ChIP。

11.1.4 至少需测定如下 3 份样本：

目标抗体

阳性对照 (ab1791)

阴性对照 (只加微珠)。

检测步骤

- 11.1.5 可以另加抗体，但需要相应增加细胞数量。阳性对照抗体详见第 11.2 节。
- 11.1.6 将抗体加入相应的样本中。抗体数量可以不同，但起始量最好为 2 - 5 μg 。
4°C 下旋转孵育过夜。
- 11.1.7 次日，根据以下描述制备抗体结合微珠。确保在每次临用前微珠悬液重悬状态一致。
- 11.1.7.1 用 1X ChIP 缓冲液（第 11.1.1 节）洗涤并重悬微珠。
- 11.1.7.2 剪下 1000 μL 移液器吸头的尖头，吸取微珠悬液。
- 11.1.7.3 确定计划中 IP 实验的次数（参考下表）。
- 11.1.7.4 吸取试样时，维持微珠在悬液中悬浮状态。
- 11.1.8 以下体积是 3 次 ChIP 试验/ 3×10^6 的用量（所有洗涤步骤需要用到的 1X ChIP 缓冲液的体积和用量，参考下表）。

注：从这一阶段开始，不再需要使用 PI 混合液

Cell Number	No. ChIP reactions	Bead Mix (μL)	1x ChIP Buffer (mL)
1×10^6	1	40	5.3
3×10^6	3	120	16.0
6×10^6	6	240	32.0
10×10^6	10	400	53.0
15×10^6	15	600	80.0
24×10^6	24	960	127.0

- 11.1.8.1 吸出 120 μL 蛋白 A 微珠悬液混合液，加入 1 mL 1X ChIP 缓冲液中。倒转混匀并沉淀微珠（3 分钟，500 g，4°C），弃上清液。
- 11.1.8.2 加入 1 mL 1X ChIP 缓冲液，倒转混匀。
- 11.1.8.3 将 300 μL 微珠/ChIP 缓冲液混合液分装在 3 个 1.5 mL 的离心管中。

11.1.8.4 离心沉淀微珠（2 分钟，500 g，4°C）。小心摒弃上清液。

11.1.9 离心（10 分钟，14000 g，4°C）沉淀第 11.1.6 节制备的抗体/染色质样本，除去不溶性物质。

11.1.10 吸出 250 μ L 上清液，加入到第 11.1.7 步和第 11.1.8 步分装的微珠中。

11.1.11 在 4°C 下旋转孵育 30 - 60 分钟。

11.1.12 孵育后，加入 1 mL 1X ChIP 缓冲液。

11.1.13 倒转轻柔混匀。

11.1.14 离心沉淀微珠（3 分钟，500 g，4°C）。小心弃去上清液。

11.1.15 用 1X ChIP 缓冲液洗涤 3 次以上。小心弃去上清液。

11.2 阳性对照详情

阳性对照靶点应在其中一个待分析的基因位点上。以下抗体可用作额外的阳性对照：

11.2.1 在活性转录基因处富集的抗体：

ab1012/ab12209/ab8580 组蛋白 H3（三甲基 K4）

ab5131 RNA 聚合酶 II CTD 重复 YSPTSPS（磷酸化 S5）

11.2.2 在活性转录基因的启动子处富集的抗体：

ab51841 TATA 结合蛋白 TBP

11.2.3 在活性位点处富集的抗体：

ab8898 组蛋白 H3（三甲基 K9）

ab6002 组蛋白 H3（三甲基 K27）

11.3 DNA 纯化

11.3.1 在样本（蛋白 A 微珠）中加入 100 μ L DNA 纯化悬液。

11.3.2 取 50 μ L 经步骤 11.1.3 冻存的染色质，加入 100 μ L DNA 纯化悬液标记为 INPUT。洗涤过的微珠样本和 INPUT 都应按照前述步骤作同样处理。

检测步骤

- 11.3.3 倒转混匀样本并在 98°C 下孵育 10 分钟。
- 11.3.4 孵育后，室温放置 20 分钟冷却。
- 11.3.5 以 10000 g 的离心力短暂离心 10 秒，去除离心管盖子上的凝结液体
- 11.3.6 加入 1 μ L 蛋白酶 K。以中等涡旋力涡旋 5 秒。
- 11.3.7 在 55°C 下孵育样本 30 分钟。
- 11.3.8 在 98°C 下孵育样本 10 分钟。
- 11.3.9 离心沉淀 DNA 悬液（1 分钟，14000 g，室温）。
- 11.3.10 将 70 μ L 上清液移入 1.5 mL 离心管。
- 11.3.11 在 DNA 悬液中加入 130 μ L PCR 级 H₂O。以中等涡旋力涡旋混匀 10 秒。
- 11.3.12 离心沉淀 DNA 悬液（1 分钟，14000 g，4°C）。
- 11.3.13 吸出 130 μ L 上清液，加入步骤 11.3.10 制备的上清液（共：200 μ L）中。
- 11.3.14 样本可用于定量 PCR 或在 -20°C 下保存，供后续分析使用。

11.4 亲和微珠详情

Species	Ig Isotype	Protein A	Protein G
Human	IgG1	+++	+++
	IgG2	+++	+++
	IgG3	-	+++
	IgG4	+++	+++
	IgM	Use anti Human IgM	
	IgE	-	+
	IgA	-	+
Mouse	IgG1	+	+++
	IgG2a	+++	+++
	IgG2b	++	++
	IgG3	+	+
	IgM	Use anti Mouse IgM	

检测步骤

Species	Ig Isotype	Protein A	Protein G
Rat	IgG1	-	+
	IgG2a	-	+++
	IgG2b	-	++
	IgG2c	+	++
Chicken	All Isotypes	-	++
Cow	All Isotypes	++	+++
Goat	All Isotypes	-	++
Guinea Pig	All Isotypes	+++	++
Hamster	All Isotypes	+	++
Horse	All Isotypes	++	+++
Pig	All Isotypes	+	++
Sheep	All Isotypes	-	++
Rabbit	All Isotypes	+++	++

12. 分析

第 10.3 节 DNA 片段分析示例

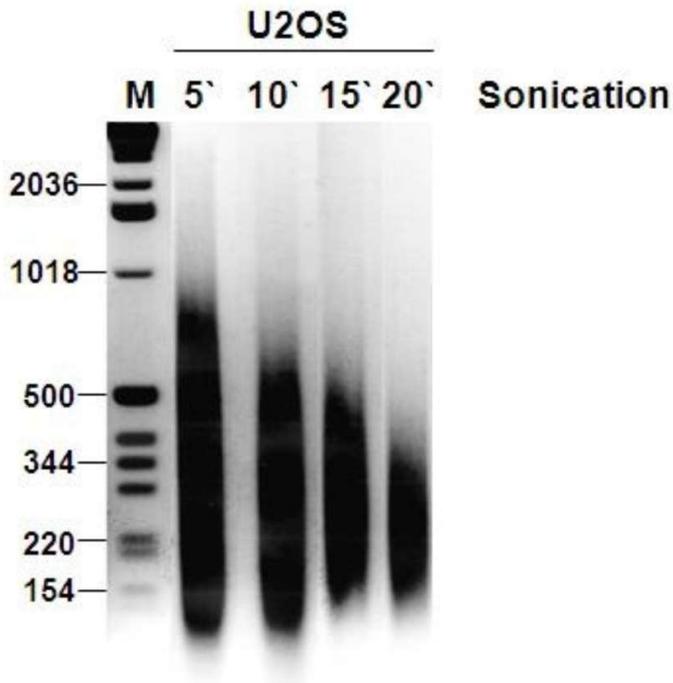


图 1.对 U2OS 细胞进行 5、10、15 和 20 分钟的超声处理。片段大小随着超声时间的增加而不断减小。15 分钟时观察到最佳片段大小。10 μ l 1.5% 琼脂糖凝胶。

13. 疑难解答

问题	原因	解决方案
PCR 产物很少或没有	组织量不足	增加组织用量（例如：>10 mg 组织/每次反应）
	交联不充分或过度	检查相应的交联步骤是否遵循实验方案
	超声处理不充分/过度	根据实验方案说明，获取适当大小的 DNA。超声处理期间，将样本置于冰上
	温度不正确/DNA 释放及交联逆转时间不足	根据实验方案提示，在适当的温度和时间下操作
	PCR 反应条件不正确	检查是否加入了所有 PCR 组分。在 PCR 反应中增加 DNA 用量。增加 PCR 反应的循环次数
	引物不正确或设计不良。	确保设计的引物对目标序列具有特异性
	未使用 90% 乙醇洗涤纯化柱	确保洗涤溶液为 90% 乙醇

相关资料

问题	原因	解决方案
样本与阴性对照之间的扩增差异很小或没有	每个洗涤步骤中，洗涤不充分	根据实验方案，正确洗涤
	错将抗体加入阴性对照孔	确保抗体加入正确的检测孔中
	PCR 循环次数过多。	若使用常规 PCR，将循环次数减少至适当的循环次数。通常在 PCR 线性扩增期测定 DNA 起始量之间的差异

14. 备注

英国、欧盟和世界其他地区

电子邮箱: technical@abcam.com | 电话: +44-(0)1223-696000

奥地利

电子邮箱: wissenschaftlicherdienst@abcam.com | 电话: 019-288-259

法国

电子邮箱: supportscientifique@abcam.com | 电话: 01-46-94-62-96

德国

电子邮箱: wissenschaftlicherdienst@abcam.com | 电话: 030-896-779-154

西班牙

电子邮箱: soportecientifico@abcam.com | 电话: 911-146-554

瑞士

电子邮箱: technical@abcam.com

电话 (德语): 0435-016-424 | 电话 (法语): 0615-000-530

美国和拉丁美洲

电子邮箱: us.technical@abcam.com | 电话: 888-77-ABCAM (22226)

加拿大

电子邮箱: ca.technical@abcam.com | 电话: 877-749-8807

中国和亚太地区

电子邮箱: hk.technical@abcam.com | 电话: 400 921 0189 / +86 21 2070 0500

日本

电子邮箱: technical@abcam.co.jp | 电话: +81-(0)3-6231-0940

www.abcam.com | www.abcam.cn | www.abcam.co.jp