

# Flag标签琼脂糖微珠法ChIP试剂盒(植物)

Flag-tag Agrose Beads Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Kit for Plant

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    |
|----|-----------------|----------------|------------------|------------------|-------|
|    |                 | IRP006<br>(6T) | IRP006M<br>(12T) | IRP006L<br>(40T) |       |
| 01 | Anti-Flag 琼脂糖微珠 | 0.25mL         | 0.5mL            | 1mL              | 4°C   |
| 02 | 裂解缓冲液           | 3.5 mL         | 7mL              | 14mL             | 4°C   |
| 03 | 漂洗液             | 12.5mL         | 25mL             | 50mL             | 4°C   |
| 04 | 洗脱缓冲液           | 0.2mL          | 0.4mL            | 0.8mL            | 4°C   |
| 05 | 10xTE 缓冲液       | 0.28mL         | 0.55mL           | 1.1mL            | 4°C   |
| 06 | NaCl (5 M)      | 0.13mL         | 0.26mL           | 0.52mL           | 4°C   |
| 07 | 蛋白酶抑制剂          | 100μL          | 0.19mL           | 0.38mL           | -20°C |
| 08 | RNase A         | 70μL           | 0.13mL           | 0.26mL           | -20°C |
| 09 | Proteinase K    | 70μL           | 0.13mL           | 0.26mL           | -20°C |

## 产品简介/Product Description

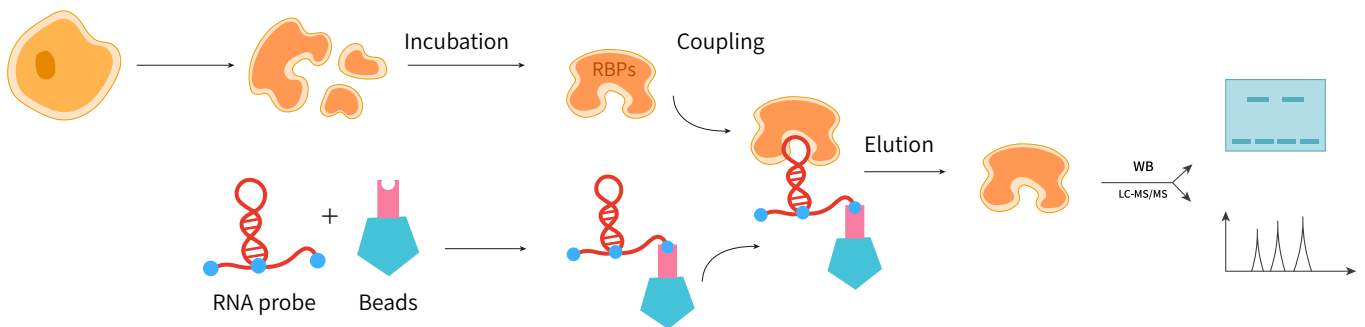
染色质免疫共沉淀 (ChIP) 是研究体内 DNA 与蛋白结合的技术。本试剂盒采用 Anti-Flag 琼脂糖微珠来高效完成 FLAG 标签融合蛋白的 ChIP 实验。Anti-FLAG 琼脂糖微珠偶联的是经过严格筛选、优化并重组表达的无轻、重链的 FLAG 抗体, 所以 IP 洗脱液中不会有抗体轻、重链污染。

实验前 FLAG 标签与目标蛋白在细胞或组织中融合表达。实验时, 先用甲醛交联细胞内的“蛋白 -DNA”

复合物，裂解细胞后，用超声波破碎 DNA 至适合的长度，采用 Anti-FLAG 琼脂糖微珠捕获细胞内的 FLAG 标签融合蛋白及其结合的 DNA 片段，去除未结合的 DNA 后，将蛋白与 DNA 解交联，提取结合的 DNA。该 DNA 可用于后续的定量 PCR 检测 (qPCR) 或高通量测序 (seq)。

## 技术路线/Technology mapping

### 1. 原理流程图



## 使用流程/Procedure

### 1. 细胞裂解及染色质超声打断

- ①将样本管置于冰上，每组加入 500  $\mu\text{L}$  裂解缓冲液、5  $\mu\text{L}$  蛋白酶抑制剂（按 1% 添加），吹打混匀。
- ②超声打断染色质，超声过程样品应始终处于冰浴中，并保持较低温度，以防染色质过热变性；超声条件因细胞类型和超声设备而异，请务必提前摸索好合适的超声打断条件，使 DNA 片段大小在合适范围；摸索超声条件时，可以先固定其他条件，先确定每次超声多长时间不会导致明显发热，再摸索不同的超声次数；需要注意的是每次超声的体积和细胞用量最好固定，否则就不能使用一个相对比较固定的超声条件用于后续实验。  
【参考条件: 非接触式全自动超声波破碎仪, 高功率, 30 s + 30 s (超声 30 s, 暂停 30 s) 超声 28 轮; 接触式超声仪, 35% 功率, 2 s + 5 s (超声 2 s, 暂停 5 s) 超声 15 min。】
- ③4 $^{\circ}\text{C}$  13000 g 离心 10 min，取上清至新的离心管中。
- ④取 5 $\mu\text{L}$  上清进行解交联（见下述步骤 4 “解交联”，其中 RNaseA 和 Proteinase K 的用量均为 1.5  $\mu\text{L}$ ），并电泳检测 DNA 片段大小；打断的 DNA 通常在 100~1000bp 中间，ChIP-Seq 要求 DNA 片段最好在 100~500 bp 之间，ChIP-qPCR 要求 DNA 片段最好在 300~1000 bp 之间。
- ⑤如果 DNA 片段化不成功，则将步骤③获得的上清液继续超声，直至获得合适大小的 DNA 片段；如果片段化成功，则从上清液中取 30  $\mu\text{L}$  作为蛋白 input，取 30 $\mu\text{L}$  作为 DNA input，剩余用于 ChIP 实验，- 80 $^{\circ}\text{C}$  保存。

#### 注意：

1. 当样本不能完全裂解时（溶液很浑浊），可以增加裂解缓冲液或改善超声条件继续裂解。超声条件因样本类型和超声设备而异，应提前摸索好合适的条件。
2. 如果样本中目标蛋白或 RNA 丰度较低，或结合物间的结合较弱，可以增加初始样本量，同时等比例增加裂解缓冲液和酶抑制剂的用量，但总孵育体积最大不超过离心管体积的 2/3，体积过大可以更换大规格离心管。

### 2. 漂洗液准备

取 10 mL 离心管，加入实验组和对照组总共所需的 3.8 mL 漂洗液，19  $\mu\text{L}$  蛋白酶抑制剂（按 0.5% 添加），混合均匀，冰上保存，现配现用。如果有多组样本，请按照实际使用量配置。

### 3. 染色质免疫共沉淀 (ChIP)

- ①将 Anti-FLAG 琼脂糖微珠上下颠倒混匀，每组取 20 $\mu$ L 琼脂糖微珠到新的离心管中；
- ③每组加入 200  $\mu$ L 漂洗液（步骤 2 准备），颠倒混匀 30 次，500g 离心 5 min，弃上清。
- ④重复上步操作一次。
- ⑤向树脂中加入步骤的样本 - 抗体混合物，放混匀仪上室温孵育 1h 或 4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。
- ⑥4  $^{\circ}$ C 500g 离心 5min，弃上清。
- ⑦每组加入 500 $\mu$ L 漂洗液，颠倒混匀 30 次，4 $^{\circ}$ C 500g 离心 5 min，弃上清。
- ⑧重复上步操作一次。再次加入 500 $\mu$ L 漂洗液，颠倒混匀 30 次；取 100 $\mu$ L 移入新离心管中用于蛋白检测，剩余 400 $\mu$ L（标注为管 2）用于 RNA 提取，两管分别 4  $^{\circ}$ C 500g 离心 5 min，弃上清。
- ⑨向管 1 中加入 20 $\mu$ L 1 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液并煮沸 3 min，500 g 离心 5 min，收集上清至新的离心管中，该 ChIP 样本与蛋白 input 都用于诱饵蛋白的 Western-Blot 检测；
- ⑩向管 2 中加入 30 $\mu$ L 洗脱缓冲液，涡旋震荡 20s，混匀仪上室温洗脱 10~15 min；涡旋震荡 20 s，1000g 离心 20s 收集上清至新的离心管中，用于解交联和 DNA 提取。

### 4. 解交联

- ①DNA Input 和 ChIP 样品置于 65 $^{\circ}$ C 孵育 6 h 或者过夜；
- ②每管加入 8 $\mu$ L RNase A，颠倒混匀 10~15 次，37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5~2 h；
- ③每管加入 8 $\mu$ L Proteinase K，55 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。

### 5. 沉淀 DNA

- ①每管分别加入 330  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O、40  $\mu$ L 10 $\times$  TE 缓冲液和 400  $\mu$ L 苯酚：氯仿：异戊醇混合液（25:24:1），颠倒混匀 10~15 次，室温 13000 g 离心 10min，转移上层水相到新的离心管中；
- ②每管加入 20  $\mu$ L NaCl 和 1 mL 无水乙醇，-20 $^{\circ}$ C 沉淀 2 h 或过夜，4 $^{\circ}$ C 16000 g 离心 30 min，去上清；
- ③加入 500  $\mu$ L 80% 乙醇洗涤沉淀，4 $^{\circ}$ C 16000 g 离心 30 min，去上清，开盖晾干乙醇；
- ④加入 20  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O，溶解沉淀 DNA，-80 $^{\circ}$ C 保存

### 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。

