



# **Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Kit For Plant**

**Catalog#JKR23002P**

**Instruction Manual (For Two Groups)**

Sufficient reagents for 6 ChIP assays per kit.

Store at -20 & 4°C

# 目录

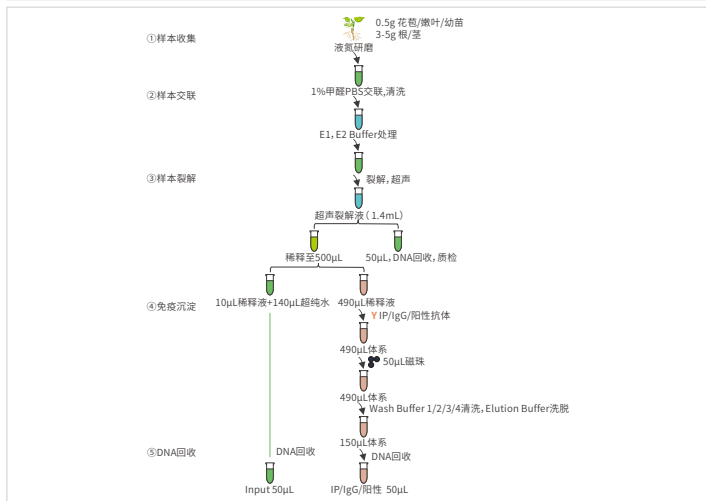
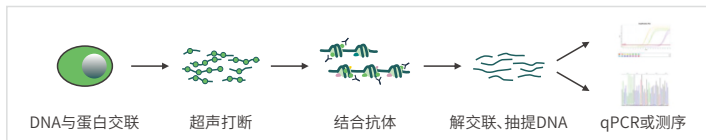
1. 实验原理	02
2. 实验流程	02
3. 试剂盒组分	03
4. 操作步骤	04
5. 实验分析	06
6. 常见问题	07



## 1. 实验原理

染色体免疫共沉淀(Chromatin Immunoprecipitation, ChIP)是用来研究蛋白质与DNA是否在体内存在相互作用,这项技术帮助研究者判断在细胞核中基因组的某一特定位置会出现何种组蛋白修饰。利用抗体抗原特异性结合,将与目的蛋白相结合的DNA片段沉淀下来,能够真实地反映结合在DNA序列上的调控蛋白。

## 2. 实验流程



### 3. 试剂盒组分

Box A					
组分	容量(6T)	保存温度	组分	容量(6T)	保存温度
10×PBS	21mL	4°C	ChIP Buffer	14mL	4°C
Glycine Buffer	7mL	4°C	DTT	54μL	4°C
4×E1 Buffer	18mL	4°C	ProteinA/G Magnetic Beads	350μL	4°C
4×E2 Buffer	23mL	4°C	Elution Buffer	1mL	4°C
Plant Lysis Buffer×2	1.4mL×2	4°C	5M NaCl	150μL	4°C

Box B					
组分	容量(6T)	保存温度	组分	容量(6T)	保存温度
Wash Buffer 1	7mL	-20°C	Normal Rabbit IgG	6μL	-20°C
Wash Buffer 2	7mL	-20°C	Normal Mouse IgG	6μL	-20°C
Wash Buffer 3	7mL	-20°C	阳性抗体(Histone-H3)	6μL	-20°C
Wash Buffer 4	14mL	-20°C	Plant Protease Inhibitor(100×)	500μL	-20°C
Proteinase K	48μL	-20°C	RNase A	24μL	-20°C

注:6T为6次单组免疫沉淀实验,ChIP-qPCR操作步骤中包含了IgG、IP、阳性(选做)3组,需消耗2-3T试剂。

试剂盒未包含下列产品:

- 37%甲醛或16%甲醛
- DNA纯化回收试剂盒
- DNA建库试剂盒
- Qubit荧光计及定量试剂盒
- SYBR Green qPCR Mix
- 阳性引物

## 4. 操作步骤

### 4.1 样本交联

#### a 花苞/嫩叶/幼苗

准备：1×PBS:取500 $\mu$ L 10×PBS,加入4.5mL超纯水,混匀;

1%甲醛PBS溶液:取27 $\mu$ L 37%甲醛溶液,加入973 $\mu$ L 1×PBS,混匀;

E1 Buffer:取250 $\mu$ L 4×E1 Buffer,加入750 $\mu$ L超纯水,混匀;

E2 Buffer:取500 $\mu$ L 4×E2 Buffer,加入1.5mL超纯水,55 $\mu$ L Plant Protease Inhibitor (100×),混匀。

- 1) 将新鲜或-80°C冻存样本(约0.5g样本),置于研钵中,在液氮中浸泡变脆,然后用液氮进行研磨,转移粉末至2mLEp管中;;
- 2) 加入1mL 1%甲醛PBS溶液吹打混匀,室温旋转孵育10min;
- 3) 加入100 $\mu$ L Glycine Buffer,室温旋转孵育5min,3000g,4°C离心5min,弃去上清;
- 4) 加入1mL预冷PBS将沉淀吹打混匀,3000g,4°C离心5min,弃去上清,再次加入1mL预冷PBS清洗1次,总计清洗2次,弃去上清;
- 5) 加入1mL E1 Buffer,涡旋混匀,冰上孵育5min,3000g,4°C离心5min,弃上清;
- 6) 加入1mL E2 Buffer(含蛋白酶抑制剂),涡旋混匀,冰上孵育10min,每3分钟涡旋一次,孵育完成后静置1-3min吸取上层混悬液,弃下层大颗粒,上层混悬液3000g,4°C离心5min,弃上清;
- 7) 再次加入1mL E2 Buffer(含蛋白酶抑制剂),涡旋混匀,冰上孵育10min,每3分钟涡旋一次,3000g,4°C离心5min,弃上清(如上清仍未透明可继续此操作)。

#### b 根/茎

准备：1×PBS:取3mL 10×PBS,加入27mL超纯水,混匀;

1%甲醛PBS溶液:取270 $\mu$ L 37%甲醛溶液,加入9730 $\mu$ L 1×PBS,混匀;

E1 Buffer:取2.5mL 4×E1 Buffer,加入7.5mL超纯水,混匀;

E2 Buffer:取2.75mL 4×E2 Buffer,加入8.25mL超纯水,55 $\mu$ L Plant Protease Inhibitor (100×),混匀。

- 1) 将新鲜或-80°C冻存样本(3-5g样本),置于研钵中,在液氮中浸泡变脆,然后用液氮进行研磨,转移粉末至50mL离心管中;
- 2) 加入10mL 1%甲醛PBS溶液、吹打混匀,室温旋转孵育10min;
- 3) 加入1mL Glycine Buffer,室温旋转孵育5min,3000g,4°C离心5min,弃去上清;

- 4) 加入10mL预冷PBS涡旋混匀, 3000g, 4°C离心5min, 弃去上清, 再次加入10mL预冷PBS清洗1次, 总计清洗2次, 弃去上清;
- 5) 加入10mL E1 Buffer, 涡旋混匀, 冰上孵育5min, 3000g, 4°C离心5min, 弃上清;
- 6) 加入10mL E2 Buffer (含蛋白酶抑制剂), 涡旋混匀, 冰上孵育10min, 每3分钟涡旋1次, 将混悬液过200目细胞筛或两层Miracloth滤布, 滤液3000g, 4°C离心5min, 弃上清;
- 7) 加入1mL E2 Buffer (含蛋白酶抑制剂), 涡旋混匀, 转移液体至2mL EP管中冰上孵育10min, 每3分钟涡旋一次, 3000g, 4°C离心5min, 弃上清。(如上清仍未透明可继续此操作)

注: 交联温度需始终保持低于25°C; 不同类型样本甲醛浓度和交联时间有所差异, 可按照已探索好的条件进行调整。

## 4.2 样本裂解

准备: 取377.5μL Plant Lysis Buffer加入15μL Plant Protease Inhibitor(100×), 7.5μL DTT, 混匀 (Lysis Buffer使用时若发现有少量沉淀或浑浊, 属于正常现象, 可放置室温或37°C加热后使用)。

- 1) 裂解: 在上一步交联好的样本沉淀中, 加入400μL Lysis Buffer 4°C旋转孵育30min, 或冰上静置裂解30min, 每5min涡旋混匀一次, 然后加入1mL ChIP Buffer混匀;
- 2) 超声: 低温超声打断 (根据不同类型的超声仪进行预实验摸索最佳打断条件, 参考条件: 18%或50瓦的功率, ON 1S, OFF 1S, 超声15min), 超声后10000g, 4°C离心10min, 收集上清 (此步骤可暂停, -20°C存放样本);
- 3) 解交联: 取50μL上清, 加入100μL超纯水, 1μL RNase A, 混匀37°C孵育5min, 继续加入6μL 5M NaCl, 2μL Proteinase K, 65°C孵育3h或过夜;
- 4) 回收DNA: 使用DNA纯化回收试剂盒按说明书进行操作, 最后用50μL超纯水洗脱 (此样本也可作为Input);
- 5) 质检: 使用Qubit荧光计测定DNA浓度, 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测DNA片段大小 (ChIP-qPCR片段集中在200-700 bp, ChIP-seq片段集中在300 bp左右最佳)。

## 4.3 磁珠准备 (单个IP反应)

- 1) 将Protein A/G Magnetic Beads从4°C冰箱取出, 上下颠倒混匀数次, 取50μL到1.5mL EP管中;
- 2) 加入200μL预冷的ChIP Buffer重悬磁珠, 置于磁力架上静置2min, 吸弃上清, 重复该步骤1次, 共洗涤2次。

## 4.4 免疫沉淀 (单个IP反应)

根据实验需求, 进行实验分组, ChIP-qPCR分组为: Input, IgG, IP, 阳性 (选做) 组, 需要做2-3个IP反应。ChIP-seq分组为: Input, IP组, 需要做1个IP反应。

- 1) 根据质检测定的DNA浓度,用ChIP Buffer对超声裂解的上清样本进行稀释,使终体积为500 $\mu$ L(组蛋白靶标DNA浓度稀释至10-20 $\mu$ g/mL,转录因子靶标DNA浓度稀释至20-40 $\mu$ g/mL),取10 $\mu$ L稀释后样本,加入140 $\mu$ L超纯水,作为Input放置-20 $^{\circ}$ C,与富集后的样本一起解交联回收;
- 2) 取490 $\mu$ L稀释后的样本,加入3-5 $\mu$ g目标抗体(IP组)或1 $\mu$ L同种属IgG(IgG组)或3 $\mu$ L阳性抗体(阳性组),4 $^{\circ}$ C旋转孵育3h或过夜;
- 3) 取出孵育完成样本,瞬时离心3S,加入到处理好的磁珠管中,4 $^{\circ}$ C旋转孵育2h;
- 4) 将样本从静音混合器中取出,置于磁力架上静置2min,弃上清;
- 5) 加入1mL Wash Buffer1重悬磁珠,置于磁力架上静置2min,弃上清;
- 6) 加入1mL Wash Buffer2重悬磁珠,置于磁力架上静置2min,弃上清;
- 7) 加入1mL Wash Buffer3重悬磁珠,置于磁力架上静置2min,弃上清;
- 8) 加入1mL Wash Buffer4重悬磁珠,置于磁力架上静置2min,弃上清,重复一次此步骤,最后瞬时离心3S,弃上清收获沉淀。

## 4.5 洗脱回收

准备: 将Elution Buffer从4 $^{\circ}$ C取出,恢复室温直至液体完全溶解(可37 $^{\circ}$ C加热溶解)。

- 1) 在上一步磁珠沉淀中加入150 $\mu$ L Elution Buffer涡旋混匀,室温下旋转孵育15min,瞬时离心3S,置于磁力架上静置2min,取上清;
- 2) 加入1 $\mu$ L RNase A,混匀37 $^{\circ}$ C孵育5min。继续加入6 $\mu$ L 5M NaCl,2 $\mu$ L Proteinase K,65 $^{\circ}$ C孵育3h(Input在此步骤开始同步操作);
- 3) 使用DNA纯化回收试剂盒按说明书进行操作,最后用50 $\mu$ L超纯水洗脱。

## 5. 实验分析

### 5.1 ChIP-qPCR(选做)

- 1) 反应程序:将Input、IP、IgG、阳性样本分别取2 $\mu$ L加入到PCR反应孔中,每个样品三复孔,其余组分按照SYBRGreenqPCRMix说明书进行添加,加完后做好标记瞬时离心10s,放入荧光定量PCR仪中上机检测。详细点样方式如下((阳性样本只做阳性引物确认是否富集,阳性引物需自行设计合成:根据对应物种GAPDH/RPL30/Tubulin/Actin等管家基因设计引物):

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
阳性引物	A	Input	Input	Input	IgG	IgG	IgG	IP	IP	IP	阳性	阳性	阳性

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Primer1	B	Input	Input	Input	IgG	IgG	IgG	IP	IP	IP			
Primer2	C	Input	Input	Input	IgG	IgG	IgG	IP	IP	IP			
...	...	Input	Input	Input	IgG	IgG	IgG	IP	IP	IP			

## 2) 结果计算

$$\Delta Ct [\text{normalized ChIP}] = (Ct [\text{ChIP}] - (Ct [\text{Input}] - \log_2 (\text{Input Dilution Factor})))$$

$$\text{Input Dilution Factor} = (\text{fraction of the input chromatin saved}) - 1$$

注：本公司项目以及试剂盒中，Input Dilution Factor = 50，即  $\log_2(50) = 5.644$

$$\Delta \Delta Ct [\text{ChIP/NIS}] = \Delta Ct [\text{normalized ChIP}] - \Delta Ct [\text{IgG}]$$

$$\text{Fold Enrichment} = 2^{\Delta \Delta Ct [\text{ChIP/NIS}]}$$

$$\% \text{Input} = 2\% \times 2^{\Delta \Delta Ct [\text{ChIP/NIS}]}$$

## 5.2 ChIP-seq (选做)

- 1) 建库：取适量Input和IP样本，按照DNA建库试剂盒说明书进行操作。
- 2) 文库质检
- 3) 测序
- 4) 生信分析

## 6. 常见问题

### Q1: 怎么探索超声条件

- 1) 接触式超声仪：取2mL EP管，加入1.4mL液体，将探头置于EP管中心，液面下约一半的位置，设置超声时间为10S，逐渐增加功率，直至开始起泡，此时功率为超声最大功率。在此基础上设置三个不同的功率梯度和时间梯度进行探索。
- 2) 非接触式：可按厂家推荐进行探索。

### Q2: 超声后片段不符合要求

- 1) 有符合要求的片段也有比较集中无法超声的大片段，可能是交联温度过高，交联时始终保持温度低于25°C，尤其是夏天温度较高可将试剂和样本放置空调出风口一段时间再进行操作。
- 2) 片段很集中且小于200bp，超声功率和时间不合适，需要做预实验探索最佳超声条件。



**Q3:IP和IgG样本Ct值没有差异**

- 1) 抗体没有富集到DNA,可更换抗体尝试。
- 2) IgG背景过高,可增加洗涤次数或减少免疫沉淀步骤DNA投入量。
- 3) 结合位点预测错误,需重新设计引物。

**Q4:溶解曲线异常**

溶解曲线非单一峰,可能为非特异扩增或有引物二聚体等情况,需重新设计引物。

**Q5:样本DNA浓度很低,低于10ng/μL**

- 1) 样本投入量过少:考虑增加样本初始投入量,尤其是肌肉,心脏等。
- 2) 裂解不完全:样本过度交联或研磨不充分。
- 3) 如遇难裂解样本可在加入LysisBuffer后-80°C急速冷冻,37°C解冻,反复冻融3次。

## 简化版操作手册

### 1. 样本交联

- 1) 取适量样本液氮研磨粉碎, 加入1mL 1%甲醛PBS溶液, 室温旋转孵育10min;
- 2) 加入100 $\mu$ L Glycine Buffer, 室温旋转孵育5min, 3000g, 4°C离心5min, 弃去上清;
- 3) 1mL预冷PBS清洗2次;
- 4) 加入1mL E1Buffer, 涡旋混匀, 冰上孵育5min, 3000g, 4°C离心5min, 弃上清;
- 5) 加入1mL E2Buffer 涡旋混匀, 冰上孵育10min, 静置1-3min吸取上层混悬液;
- 6) 再次入1mL E2 Buffer, 冰上孵育10min, 3000g, 4°C离心5min, 弃上清。

注: 根/茎参照说明书增加反应体系

### 2. 样本裂解

- 1) 加入400 $\mu$ L Plant Lysis Buffer (含Protease Inhibitor, DTT) 4°C旋转孵育30min, 或冰上静置裂解30min;
- 2) 低温超声, 超声后10000g, 4°C离心10min, 取上清 (参考条件: 18%或50瓦的功率, ON 1S, OFF 1S, 超声15min);
- 3) 取50 $\mu$ L上清, 加入100 $\mu$ L超纯水, 1 $\mu$ L RNase A, 混匀37°C孵育5min, 继续加入6 $\mu$ L 5M NaCl, 2 $\mu$ L Proteinase K, 65°C孵育3h或过夜;
- 4) DNA回收, 最后50 $\mu$ L超纯水洗脱;
- 5) 测定回收的DNA浓度, 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测DNA片段大小。

### 3. 磁珠准备

- 1) 取50 $\mu$ L ProteinA/G Magnetic Beads;
- 2) 200 $\mu$ L预冷的ChIP Buffer清洗磁珠2次。

### 4. 免疫沉淀

- 1) 用ChIP Buffer稀释样本, 取10 $\mu$ L稀释后样本, 加入140 $\mu$ L超纯水, 作为Input放置-20°C;
- 2) 取490 $\mu$ L稀释后的样本, 加入3-5 $\mu$ g目标抗体 (IP组) 或1 $\mu$ L同种属IgG (IgG组) 或3 $\mu$ L阳性抗体 (阳性组), 4°C旋转孵育3h或过夜;
- 3) 孵育完成后加入到处理好的磁珠管中, 4°C旋转孵育2h;
- 4) 分别用Wash Buffer1、Wash Buffer2、Wash Buffer 3、清洗磁珠1次, Wash Buffer4清洗磁珠2次。

## 5. 洗脱回收

- 1) 150 $\mu$ L Elution Buffer; 涡旋混匀, 室温下旋转孵育15min;
- 2) 加入1 $\mu$ L Rnase A, 混匀37°C孵育5min。继续加入6 $\mu$ L 5M NaCl, 2 $\mu$ L Proteinase K, 65°C孵育3h (Input在此步骤开始同步操作);
- 3) DNA回收, 50 $\mu$ L超纯水洗脱。

## 6. 实验分析

- 1) ChIP-qPCR (选做)
- 2) ChIP-seq (选做)



## 武汉金开瑞生物工程有限公司

WUHAN GENE CREATE BIOLOGICAL ENGINEERING CO., LTD.

地址：湖北省武汉市江夏区神墩五路北武汉生之源股份生物科创产业园

电话：027-87960366

邮箱：[marketing@genecreate.com](mailto:marketing@genecreate.com)

网址：[www.genecreate.cn](http://www.genecreate.cn)

