

ChiP assay protocol

2022-06-16 권정원 작성

Materials

1. Cells ($1 \times 10^7 \sim 3 \times 10^7$ 필요)
2. 1% PFA (final 농도)
3. 125mM glycine (final 농도)
4. Water sonicator
5. IgG antibody (rabbit, mouse 에 따라 다르게)
6. Target antibody
7. Rotator
8. Protein G beads (santa cruz, sc-2002)
9. 0.1% BSA (final 농도)
10. RIPA buffer (조성 참고)
11. FA lysis buffer (조성 참고)
12. Elution buffer (조성 참고)
13. Proteinase K (바이오팩트, PE283-50H)
14. Phenol-Chloroform-isoamyl alcohol mixture (sigma, P3803)
15. 5M NaCl
16. 70% EtOH
17. DEPC-W

Methods

Day 1

1. Live cells 에 final 1% PFA 가 되도록 media 에 dropping 후 RT 10-15분
2. Final 125mM glycine이 되도록 media 에 dropping 후 RT 5분

3. PBS washing 3번
4. PBS 1ml 넣고 scrapping, 1300rpm 5분 centrifuge
5. FA buffer 1ml 넣고 pipetting 후 RT 10분
6. Sonication (세포에 따라 조건 잡아야 함)
7. 8000 rpm, 10분, 4°C
8. 상층액을 새로운 tube에 옮김
9. IP sample/IgG sample을 동일한 volume으로 aliquot, Input sample 은 1/10, Input을 제외한 sample의 total volume을 RIPA buffer 로 1ml로 맞춤
10. IgG 포함한 항체를 각 sample 에 넣음 (4~8ul)
11. Rotator 에서 overnight, 4°C, Input은 -20°C 보관

Day 2

1. Protein G beads 를 blocking (final 0.1% BSA, beads는 sample 당 15ul씩)
2. Beads의 volume 2-3배의 RIPA buffer로 washing 3번 (8000 rpm, 1분, RT)
3. 0.1% BSA로 beads coating (rotator, 4°C, 30분)
4. Beads를 RIPA buffer로 washing 1번 하고 beads volume 의 2배 RIPA buffer 넣음
5. Sample 당 beads 15ul씩 넣음
6. Rotator 에서 1시간, 4°C
7. 8000 rpm, 1분 centrifuge
8. Wash buffer 1ml씩 넣고 3번 washing
9. Final wash buffer 1ml 넣고 1번 washing
10. Elution buffer 120ul 넣고 tapping 후 tube에 마개를 끼운 후 65°C 건조기에서 15분 incubation. (5-10분 마다 tapping)
11. 8000 rpm, 2분 centrifuge
12. 상층액을 새로운 tube 에 옮기고 10mM Tris buffer 로 total 400ul 로 맞춤. (Input도 같이)
13. Proteinase K (10mg/ml)을 10ul 씩 넣음

14. 마개로 뚜껑 고정 후 65°C 건조기에서 overnight

Day 3

1. 건조기에서 sample을 꺼낸 후 5-10분 RT incubation
<DNA precipitation>
2. PCI 을 sample과 동일 volume 으로 넣음
3. Vortex 10초후 10분 RT incubation
4. 12000 rpm, 15분, 4°C centrifuge
5. Centrifuge 후 2개의 층으로 나뉘는 것을 확인, 투명한 상층액을 350ul 만 따서 새로운 tube 에 옮김
6. Sample 400ul 기준 isopropanol 400ul, 0.1M sodium acetate (pH 5.3) 40ul 넣고 inverting 5번
7. -20°C, 1시간 incubation (or -80°C, 15분 incubation)
8. 12000 rpm, 15분, 4°C centrifuge
9. 상층액 suction 후 75% EtOH 1ml씩 넣어 washing
10. 12000 rpm, 5분, 4°C centrifuge
11. EtOH 제거 후 50ul DEPC water 로 dilution
12. Real time PCR 진행

FA lysis buffer (+protease inhibitor)

Stock Con.		40ml 기준	Final Con.
5M	HEPES-KOH pH7.5	400ul	50mM
5M	NaCl	1.12ml	140mM
500mM	EDTA	80ul	1mM
10%	Triton X-100	4ml	1%
10%	Sodium deoxycholate	400ul	0.1%
10%	SDS	400ul	0.1%

RIPA lysis buffer

Stock Con.		40ml 기준	Final Con.
1M	Tris-HCl pH8	2ml	50mM
5M	NaCl	1.2ml	150mM
500mM	EDTA	160ul	2mM
10%	Triton X-100	4ml	1%
10%	Sodium deoxycholate	2ml	0.5%
10%	SDS	400ul	0.1%

Wash buffer

Stock Con.		40ml 기준	Final Con.
1M	Tris-HCl pH8	800ul	20mM
5M	NaCl	1.2ml	150mM
500mM	EDTA	160ul	2mM
10%	Triton X-100	4ml	1%
10%	SDS	400ul	0.1%

Final wash buffer

Stock Con.		40ml 기준	Final Con.
1M	Tris-HCl pH8	800ul	20mM
5M	NaCl	4ml	500mM
500mM	EDTA	160ul	2mM
10%	Triton X-100	4ml	1%
10%	SDS	400ul	0.1%

Elution buffer

Stock Con.		10ml 기준	Final Con.
10%	SDS	1ml	1%
1M	NaHCO ₃	1ml	100mM