

Code No. 5333

研究用

Takara

EpiScope[®] Nucleosome
Preparation Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	2
● 保 存	2
● 试剂盒外必备试剂与仪器	2
● 使用注意	2
● 操作方法	2
● 附 录	3
● Troubleshooting	4
● 关联产品	5

● 制品说明

真核生物细胞的细胞核中存在的核小体 (nucleosome) 是染色质的基本构成单位, 它是由组蛋白为核心和缠绕于组蛋白的基因组 DNA 共同组成的。目前我们已经知道基因组 DNA 上的核小体 DNA 是以一定的间隔存在的, 它的存在位置与染色质构造及转录调控机制有着密切关系, 因此在基因表达调控研究中的重要领域——表观遗传学研究中, 核小体作为重要的研究对象之一。具有转录活性的基因其启动子区域中不存在核小体, 一直处于转录起始时可与必要的转录因子结合的状态。一旦该区域的 DNA 发生甲基化, 此部位就会形成核小体, 转录因子不能与启动子区域结合使转录受到抑制。

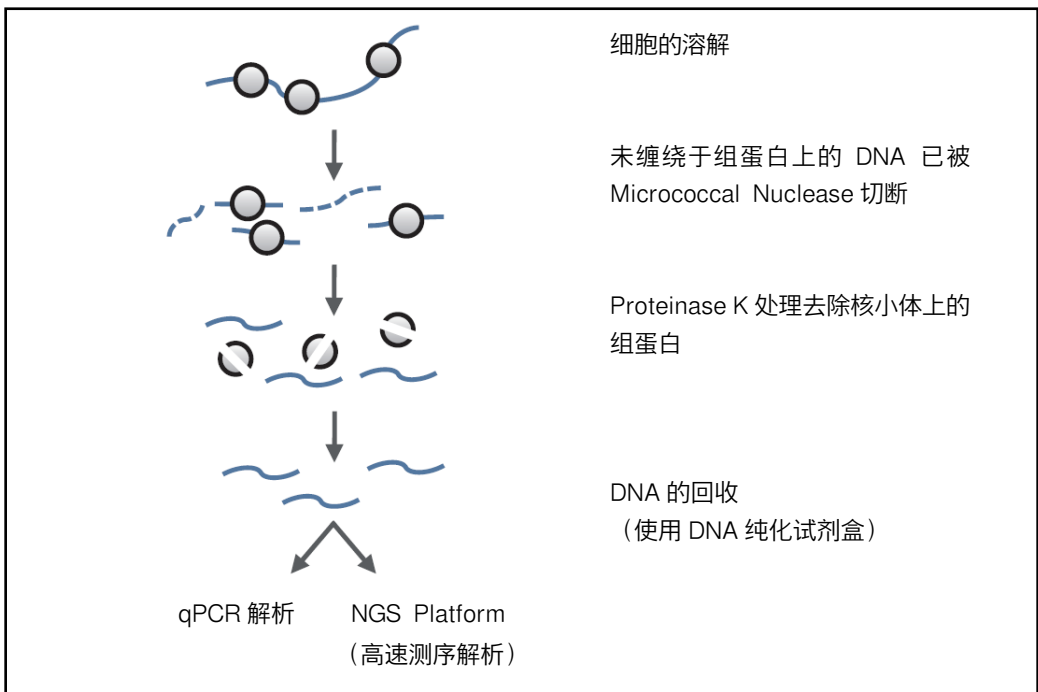
本制品是从动物培养细胞中制备核小体的专用试剂盒。从制备的核小体提取 DNA 后, 利用 Real Time PCR 及高速测序可以解析核小体在基因组上的位置。

本制品的操作流程如下:

1. 细胞的溶解与细胞核的离心沉降。
2. Micrococcal Nuclease 切断未缠绕在组蛋白上的 DNA。
3. Proteinase K 处理去除组蛋白。
4. DNA 的回收 (需要另备 DNA 纯化试剂盒, 如 Clontech Code No. 740609.10/.50/.250)

使用本制品回收的 DNA 为已形成核小体的基因组 DNA 区域, 未缠绕于组蛋白上的基因组 DNA 已被 Micrococcal Nuclease 切断。

[注意] 本试剂盒不适用于经 EpiScope ChIP Kit (anti-mouse IgG) (Code No. 5331) 等交联处理后细胞的染色质片段使用。



● 制品内容 (50 次量)

Package 1:

3. Micrococcal Nuclease (20 U/ μ l)	50 μ l
4. Micrococcal Nuclease Buffer (10 \times)	1 ml
5. RNase A (20 mg/ml)	100 μ l
6. 0.5 M EDTA	100 μ l
7. Proteinase K	200 μ l
8. LINE-1 qPCR Primer (10 μ M each)*	50 μ l

Package 2

1. Cytoplasmic Lysis Buffer	25 ml \times 2
2. Protease Inhibitor Cocktail (100 \times)	550 μ l

* 使用 Real Time PCR 进行相对定量解析时, 作为校正基因组 DNA 量的参考来使用。因为是人基因组 DNA 检出用引物, 不可用于其他物种的检测。

● 保存

Package 1: -20°C 。

Package 2: 4°C 。

● 试剂盒外必备材料

PCR 仪:

如 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient (Code No. TP600) 等。

DNA 纯化试剂盒:

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Clontech Code No. 740609.10/.50/.250) 等。

电泳装置:

如 Mupid-exU (Code No. EXU-1) 等。

● 使用注意

下面是本试剂盒的使用注意事项, 请务必在使用前认真阅读。

1. 酶类试剂使用前请轻微离心, 然后置于冰上。
2. Protease Inhibitor Cocktail、Micrococcal Nuclease Buffer (10 \times) 和 0.5 M EDTA 使用前在室温下融解, 混匀后离心, 在室温下使用。使用后于各温度保存。
3. 室温下配制 Micrococcal Nuclease 反应液混合液, 配制混合液时最后添加 Micrococcal Nuclease。(冰上配制会出现盐析, 出现盐析时请于 37°C 融解。)

● 操作方法

A. 细胞回收与溶解

1. 从培养皿中回收细胞, 按 1×10^6 cells/ml 比例加入适量的 PBS 悬浮后, 分装于 1.5 ml 离心管中 (每管分装 1 ml 悬浮液)。[注] 一个反应体系建议处理约 $0.5 \sim 2 \times 10^6$ cells。
2. 3,000 rpm、 4°C 离心 3 min 后, 弃上清, 回收细胞。
3. 加入 10 μ l Protease Inhibitor Cocktail。
4. 加入 1 ml Cytoplasmic Lysis Buffer 后, 充分吸打混匀。
5. 冰上静置 10 min。

6. 5,200 rpm、4°C离心 10 min。离心期间，取 10 μ l 的 10×Micrococcal Nuclease Buffer 用灭菌水稀释，配制成 100 μ l 的 1× Micrococcal Nuclease Buffer。
7. 离心后，弃去上清。
8. 向离心沉淀物中（含细胞核）加入 50 μ l 的 1×Micrococcal Nuclease Buffer，充分吸打混匀，作为细胞核悬浮液使用。

[注] 添加 1×Micrococcal Nuclease Buffer 后，充分吸打悬浮至无沉淀物。（充分吸打后有时也会有少量的沉淀，此时不需要再吸打悬浮）。

B. 使用 Micrococcal Nuclease 处理

1. 在室温下配制反应液（请配制过量反应液，以避免微型移液枪误差或操作失误）。

试剂	使用量
Micrococcal Nuclease (20 U/ μ l)	0.2 μ l
Micrococcal Nuclease Buffer (10 ×)	5 μ l
RNase A (20 mg/ml)	2 μ l
Protease Inhibitor Cocktail (100 ×)	1 μ l
灭菌水	up to 50 μ l

[注] · 上述反应液在冰上配制会出现盐析，请务必在室温下配制。

· 在反应开始前快速添加 Micrococcal Nuclease。

2. 取 50 μ l 混合液分装于 0.2 ml microtube 中，再加入 50 μ l A-7 的细胞核悬浮液后混合。
3. 37°C温浴 30 min（使用 Thermal Cycler Dice）。
4. 向 microtube 中加入 2 μ l 的 0.5 M EDTA，停止反应。
5. 加入 4 μ l Proteinase K 后 37°C温浴 30 min（使用 Thermal Cycler Dice）。接下来进行“C. DNA 的提取”操作步骤。

C. DNA 的提取

1. 使用 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit（单独购买）从 B-5. 的 Proteinase K 处理后样品中提取 DNA。
 - ① 向 106 μ l Proteinase K 处理后样品中加入 212 μ l Buffer NT1。
 - ② 将 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column 置于 2 ml Collection Tube 上，将①的溶液加入到 Column 中后，11,000g 离心 1 min。弃滤液后置于同一个 Collection Tube 上。
 - ③ 向 Column 中加入 700 μ l Wash Buffer NT3（含乙醇），11,000g 离心 1 min。弃滤液后置于同一个 Collection Tube 上。
 - ④ 将 Column 进行离心，11,000g、2 min。
 - ⑤ 将 Column 置于 1.5 ml microtube 上（1.5 ml microtube 自备），加入 50 μ l Buffer NE 室温静置 1 min 后，11,000g 离心 1 min，获得 DNA 溶液。
2. 取一部分回收的 DNA 溶液（约 5 μ l）进行琼脂糖凝胶电泳，确认 DNA 片段大小。（参见附录 2.）。

● 附录

1. 使用 Real Time PCR 进行核小体 DNA 的解析。

使用本制品制备的核小体 DNA 进行 Real Time PCR 解析，在进行“操作方法”C 步骤利用 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up 提取 DNA 时，使用约 50 μ l Buffer NE 进行洗脱。通常使用 2 μ l 洗脱液作为 Real Time PCR 反应的模板。以下为使用 Real Time PCR 专用试剂盒 TB Green[®] Premix Ex Taq

GC (Perfect Real Time) 和 Thermal Cycler Dice Real Time System // (终卖) 进行 Real Time PCR 反应的实验例。

① 按下列组分于冰上配制 PCR 反应液。

试剂	使用量
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> GC (2×)	12.5 μl
Forward Primer (10 μM)	0.5 μl
Reverse Primer (10 μM)	0.5 μl
Template	2.0 μl
灭菌水	9.5 μl

② 开始 PCR 反应。

首先使用下面的标准操作流程进行 Real Time PCR 反应。必要时调整到 PCR 反应适宜条件。

95°C 30 sec → (95°C 5 sec / 60°C 30 sec) × 40 Cycles → 融解曲线分析

2. Micrococcal Nuclease 的使用量及 DNA 片段大小研讨。

【方法】

取 1×10^6 个 HeLa 细胞，按照本产品的操作方法进行了处理，但 Micrococcal Nuclease 的使用量分别为 0.02 μl、0.05 μl、0.2 μl。然后使用 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up 进行 DNA 提取，从提取后的 50 μl DNA 溶液中取 5 μl 用于琼脂糖凝胶电泳。

【结果】

Micrococcal Nuclease 使用量过少时 (0.02 μl, 0.05 μl)，单核小体以外的两个核小体和三个核小体来源的 DNA 带的比率有所增多；Micrococcal Nuclease 使用量越多 (0.2 μl)，单核小体来源的 DNA 片段就越小。产生这种结果的原因是由于 Micrococcal Nuclease 从 DNA 两端逐渐酶解造成的。(参考 Clark DJ (2010) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **27**:781–793.)。

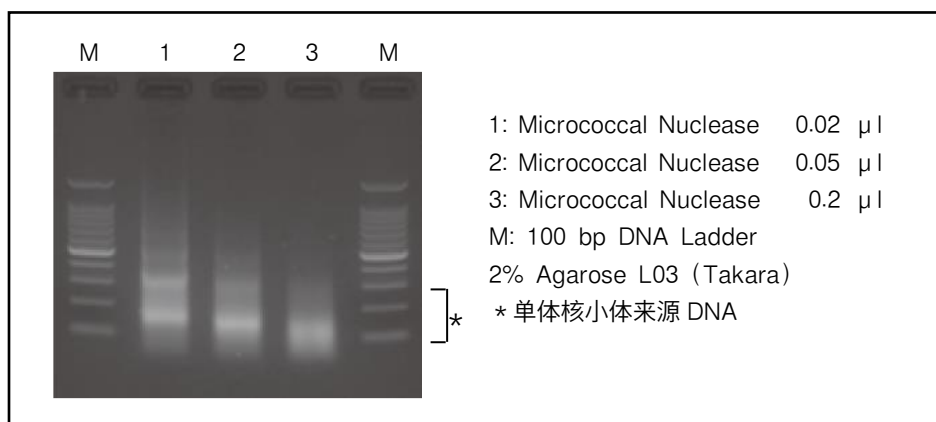


图 2. 核小体 DNA 大小分布的确认

● Troubleshooting

按照本产品操作方法制备的 DNA 核小体化不充分时，可以考虑有以下几种原因。

1. Micrococcal Nuclease 的使用量过少。Micrococcal Nuclease 使用量过少时，DNA 的核小体化就会不充分。(参考附录 2)

2. 1 × Micrococcal Nuclease Buffer 对离心沉淀物的分散悬浮不充分。
「操作方法 A-8」中，向离心沉淀物中添加 1 × Micrococcal Nuclease Buffer 后，请充分吸打悬浮直至无沉淀物。

● 关联产品

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Clontech Code No. 740609.10/.50/.250)

TB Green[®] *Premix Ex Taq*[™] GC (Perfect Real Time) (Code No. RR071A/B)

Micrococcal Nuclease (Code No. 2910A)

EpiScope and TB Green are registered trademarks of Takara Bio Inc.

Thermal Cycler Dice and *Premix Ex Taq* are trademarks of Takara Bio Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686
4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>