

染色质免疫沉淀(**ChIP**)实验指南

- **ChIP 基本原理**
- **ChIP 一般流程**
- **ChIP 实验步骤**
- **ChIP 注意事项**
- **ChIP 常见问题及解决方法**

ChIP 基本原理

ChIP 是在活细胞状态下固定蛋白质-DNA 复合物，并将其随机切断为一定长度范围内的染色质小片段，然后通过免疫学方法沉淀此复合体，特异性地富集目的蛋白结合的 DNA 片段，通过对目的片段的纯化与检测，从而获得蛋白质与 DNA 相互作用的信息。ChIP 不仅可以检测体内反式因子与 DNA 的动态作用，还可以用来研究组蛋白的各种共价修饰与基因表达的关系。而且，ChIP 与其他方法的结合，扩大了其应用范围：ChIP 与基因芯片相结合建立的 ChIP-on-ChIP 方法已广泛用于特定反式因子靶基因的高通量筛选；ChIP 与体内足迹法相结合，用于寻找反式因子的体内结合位点；RNA-ChIP 用于研究 RNA 在基因表达调控中的作用。由此可见，随着 ChIP 的进一步完善，它必将会在基因表达调控研究中发挥越来越重要的作用。

ChIP 一般流程

甲醛处理细胞→收集细胞，超声破碎→加入目的蛋白的抗体，与靶蛋白-DNA 复合物相互结合→加入 ProteinA，结合抗体-靶蛋白-DNA 复合物，并沉淀→对沉淀下来的复合物进行清洗，除去一些非特异性结合→洗脱，得到富集的靶蛋白-DNA 复合物→解交联，纯化富集的 DNA-片段→qPCR 分析。

在 qPCR 分析这一块，比较传统的做法是半定量-PCR。但是现在随着荧光定量 PCR 的普及，纽普生物建议使用 qPCR，更能反映实验结果。

此外，RIP 其实就是用 ChIP 的方法研究细胞内蛋白与 RNA 的相互结合，具体方法和 ChIP 差不多，只是实验过程中要注意防止 RNase 对 RNA 的降解，最后分析的时候需要先将 RNA 逆转录成为 cDNA；ChIP-ChIP 其实就是 ChIP 富集得到的 DNA-片段，拿去做芯片分析，做法在 ChIP 的基础上有所改变，不同的公司有不同的做法，要根据公司的要求来准备样品。

ChIP 实验步骤

以下介绍的经典操作流程需要三天时间。

第一天：

(一) 细胞的甲醛交联与超声破碎。

- 1、取出 1 平皿细胞(10cm 平皿) 加入 243 μ l 37%甲醛，使得甲醛的终浓度为 1%(培养基共有 9ml)
- 2、37 $^{\circ}$ C 孵育 10min。
- 3、终止交联：加甘氨酸至终浓度为 0.125M。450 μ l 2.5M 甘氨酸于平皿中。混匀后，在室温下放置 5min 即可。
- 4、吸尽培养基，用冰冷的 PBS 清洗细胞 2 次。

5、细胞刮刀收集细胞于 15ml 离心管中（PBS 依次为 5ml，3ml 和 3ml）预冷后 2000rpm 5min 收集细胞。

6、倒去上清。按照细胞量，加入 SDS Lysis Buffer。使得细胞终浓度为每 200 μ l 含 2×10^6 个细胞。这样每 100 μ l 溶液含 1×10^6 个细胞，再加入蛋白酶抑制剂复合物。假设 MCF7 长满板为 5×10^6 个细胞。本次细胞长得约为 80% 满度，即为 4×10^6 个细胞。因此每管加入 400 μ l SDS Lysis Buffer。将 2 管混在一起，共 800 μ l。

7、超声破碎：VCX750，25% 功率，4.5s 冲击，9s 间隙。共 14 次。

（二）除杂及抗体哺育。

8、超声破碎结束后，10,000g 4 $^{\circ}$ C 离心 10min。去除不溶物质。留取 300 μ l 做实验，其余保存于 -80 $^{\circ}$ C。300 μ l 中，100 μ l 加抗体做为实验组；100 μ l 不加抗体做为对照组；100 μ l 加入 4 μ l 5M NaCl（NaCl 终浓度为 0.2M）65 $^{\circ}$ C 处理 3h 解交联，跑电泳，检测超声破碎的效果。

9、在 100 μ l 的超声破碎产物中，加入 900 μ l ChIP 稀释缓冲液和 20 μ l 的 50 \times PIC。再各加入 60 μ l Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA。4 $^{\circ}$ C 颠转混匀 1h。

10、1h 后，在 4 $^{\circ}$ C 静置 10min 沉淀，700rpm 离心 1min。

11、取上清。各留取 20 μ l 做为 input。一管中加入 1 μ l 抗体，另一管中则不加抗体。4 $^{\circ}$ C 颠转过夜。

（三）检验超声破碎的效果。

取 100 μ l 超声破碎后产物，加入 4 μ l 5M NaCl，65 $^{\circ}$ C 处理 2h 解交联。分出一半用酚/氯仿抽提。琼脂糖电泳检测超声效果。

第二天：

（一）免疫复合物的沉淀及清洗。

12、孵育过夜后，每管中加入 60 μ l Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA。4 $^{\circ}$ C 颠转 2h。

13、4 $^{\circ}$ C 静置 10min 后，700rpm 离心 1min。除去上清。

14、依次用下列溶液清洗沉淀复合物。清洗的步骤：加入溶液，在 4 $^{\circ}$ C 颠转 10min，4 $^{\circ}$ C 静置 10min 沉淀，700rpm 离心 1min，除去上清。

洗涤溶液：

- a. low salt wash buffer-one wash
- b. highsalt wash buffer-one wash
- c. LiCl wash buffer-one wash
- d. TE buffer-two wash

15、清洗完毕后，开始洗脱。洗脱液的配方：100 μ l 10%SDS，100 μ l 1M NaHCO₃，800 μ l ddH₂O，共 1ml。每管加入 250 μ l 洗脱 buffer，室温下颠转 15min，静置离心后，收集上清。重复洗涤一次。最终的洗脱液为每管 500 μ l。

16、解交联：每管中加入 20 μ l 5M NaCl（NaCl 终浓度为 0.2M）混匀，65 $^{\circ}$ C 解交联过夜。

第三天：

（一）DNA 样品的回收

17、解交联结束后，每管加入 1 μ l RNaseA（MBI）37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。

18、每管加入 10 μ l 0.5M EDTA, 20 μ l 1M Tris.HCl (PH6.5) 2 μ l 10mg/ml 蛋白酶 K。45°C 处理 2h。

19、DNA 片段的回收：omega 胶回收试剂盒。最终的样品溶于 100 μ l ddH₂O。

(二) qPCR 分析

ChIP 注意事项

IP 是利用抗原蛋白质和抗体的特异性结合以及细菌蛋白质的 proreina 特异性地结合到免疫球蛋白的 FC 片段的现象开发出来的方法。目前多用精制的 proreina 预先结合固化在 agarose 的 beads 上, 使之与含有抗原的溶液及抗体反应后, beads 上的 proreina 就能吸附抗原达到精制的目的。

首先, 实验最需要注意的就是抗体的性质。抗体不同和抗原结合能力也不同, 免染能结合未必能用在 IP 反应。纽普生物建议仔细检查抗体的说明书。特别是多抗的特异性是问题。

其次, 要注意溶解抗原的缓冲液的性质。多数的抗原是细胞构成的蛋白, 特别是骨架蛋白, 缓冲液必须要使其溶解。为此, 必须使用含有强界面活性剂的缓冲液, 尽管它有可能影响一部分抗原抗体的结合。另一面, 如用弱界面活性剂溶解细胞, 就不能充分溶解细胞蛋白。即便溶解也产生与其它的蛋白结合的结果, 抗原决定簇被封闭, 影响与抗体的结合, 即使 IP 成功, 也是很多蛋白与抗体共沉淀悲惨结果。

再次, 为防止蛋白的分解, 修饰, 溶解抗原的缓冲液必须加蛋白酶抑制剂, 低温下进行实验。每次实验之前, 首先考虑抗体/缓冲液的比例。抗体过少就不能检出抗原, 过多则就不能沉降在 beads 上, 残存在上清。缓冲剂太少则不能溶解抗原, 过多则抗原被稀释。

ChIP 常见问题及解决方法

问题	可能原因	解决办法
非特异性抗体对照背景高	非特异性结合 Protein A 或 G beads	将标本和 beads 混合孵育 1hr 后去除, 然后再加入抗体进行反应(包括预纯化标本步骤)
	ChIP 缓冲液污染了	重新配制新的缓冲液
	有些 Protein A or G beads 产生高背景	有些 Protein A/G beads 产生高背景. 尽量使用在非特异性对照中背景很低的 Protein A/G beads
背景高、电泳结果难以分辨大小	DNA 片段太大	对不同类型的细胞, DNA 片段化过程要进行优化。破碎后的 DNA 片段不应该大于 1.5 kbp。如果使用酶消化染色质的话, 应该可以看到单个核小体的存在 (175 bp)
信号弱	染色质的片段太小了	染色质超生破碎的大小不能小于 500bp。太小的片段会使的核小体被误认为核小体间的 DNA 而被消化掉。如果做 N-ChIP, 酶切反应足够来片段化染色质了
	如做的是 X-ChIP, 有可能是细胞被交联太久	用甲醛交联 10-15 分钟然后用 PBS 洗涤。细胞可能需要用甘氨酸处理以去除多余的甲醛。过度的交联会封闭抗原结合表位从而降低抗体的结合

	染色质用量不足	推荐每次实验染色质的用量是 25 ug
	免疫沉淀用抗体量不足	推荐使用 3-5 ug 抗体进行初次实验，如果没有信号则可以增加到 10ug 的用量
	特异性的抗体结合被清除了	洗液中的 NaCl 浓度不能高于 500 mM，因为这个浓度过强，有可能会消除特异性的抗体结合
	细胞没有被完全裂解	推荐使用 RIPA buffer 裂解细胞
	目标区域没有抗体被富集	抗体结合表位不存在感兴趣的 DNA 区域。使用阳性对照抗体，以保证整个操作过程的正确性，如 H3K4me3/H3K9me3 抗体对应 active/inactive promoters
	不适合使用 N-ChIP 方法	当待测蛋白和 DNA 的结合比较弱或者离 DNA 比较远时，最好使用 X-ChIP。因为交联可以避免在操作过程中蛋白质从 DNA 上脱落下来。而 Histones 通常具有很强的 DNA 亲和力，因此分析时常常用 N-ChIP
	所选的单克隆抗体可能不适合 X-ChIP 方法	在交联过程中，可能抗体的结合表位被封闭了。推荐使用多克隆抗体，因为具有多个抗原结合表位从而增加了 IP 靶蛋白的成功率
	使用了错误的抗体亲和 beads	Protein A 和 G 结合不同的 Ig。选择使用能有效结合抗体的 Protein beads。推荐使用 protein A 和 G 的葡聚糖混合物从而增加沉淀抗体的成功率
PCR 扩增出现问题	所有标本包括模板对照 PCR 结果信号均过高	real-time PCR 溶液污染了，换用新鲜配制的新溶液重新进行 PCR
	标本 PCR 结果阴性	使用 standard/input DNA 确认引物是否正确