

ChIP 实验面面观

一、ChIP实验的基本原理和主要应用？

真核生物的基因组DNA以染色质（Chromatin）的形式存在。因此，研究蛋白质与DNA在染色质环境中的相互作用是阐明真核生物基因表达机制的基本途径，而染色质免疫共沉淀（Chromatin immunoprecipitation, ChIP）技术是目前公认的研究此相互作用的最佳选择，是真核生物基因表达机制研究中不可或缺的核心技术之一。

它的基本原理是在活细胞状态下，固定蛋白质-DNA（染色质）复合物，并将其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（抗体亲和）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后期检测，从而获得蛋白质与DNA相互作用的信息。

ChIP不仅可以检测体内多种转录因子与DNA的动态作用，还可用来研究组蛋白的各种共价修饰（如磷酸化、乙酰化、甲基化、泛素化等）与不同状态下基因表达的关系。而且，ChIP与多种高通量检测方法的结合，扩大了其应用范围和测定效率：ChIP与高通量测序技术相结合建立的ChIP-seq方法已广泛用于特定转录因子靶基因的高通量分析和鉴定；ChIP与体内足迹法相结合，用于寻找转录因子的体内结合位点；RNA-ChIP用于研究RNA与蛋白的相互作用以及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。

二、ChIP实验的一般流程是怎样的？

ChIP的一般流程是：甲醛固定细胞---收集细胞，将染色质复合物中DNA切割---加入目的蛋白的抗体，与靶蛋白-DNA复合物相互结合---加入Protein A或Protein G微珠，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---PCR或测序分析。

随着ChIP技术的不断优化，在对甲醛固定的染色质复合物中DNA进行切割时，传统超声随机打断DNA的方法逐渐被酶解法所替代。利用微球菌核酸酶的切割特性（在染色质核小体之间的DNA更容易被切开），可以快速温和地将染色质DNA切断，且最大限度地保持了细胞原有染色质结构以及目的蛋白与DNA的结合状态，使ChIP的准确性和结果可信度大大提高。

CST推出的SimpleChIP® 酶解法试剂盒，含有标准ChIP流程所需的整套试剂、阳性对照抗体（Histone H3 (D2B12) XP® Rabbit mAb (ChIP Formulated) #4620）、ChIP引物等，方法简便易行，与CST多种高质量的ChIP级抗体配合使用，将使您的ChIP实验质量提升到一个新的水平。有关具体操作方法，请参考CST官方网站获取：

<http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=resources-protocols>

三、 ChIP实验关键步骤和需要注意的细节

1、 细胞培养及固定

进行一次ChIP实验所需的最低细胞数为 10^5 左右，CST标准操作方法所需的细胞数为 4×10^6 ，一般会选择10cm直径的培养皿进行细胞培养（80-90%汇合率）。为了帮助细胞计数，可以再多培养一皿细胞，进行每一皿细胞数目的估测。

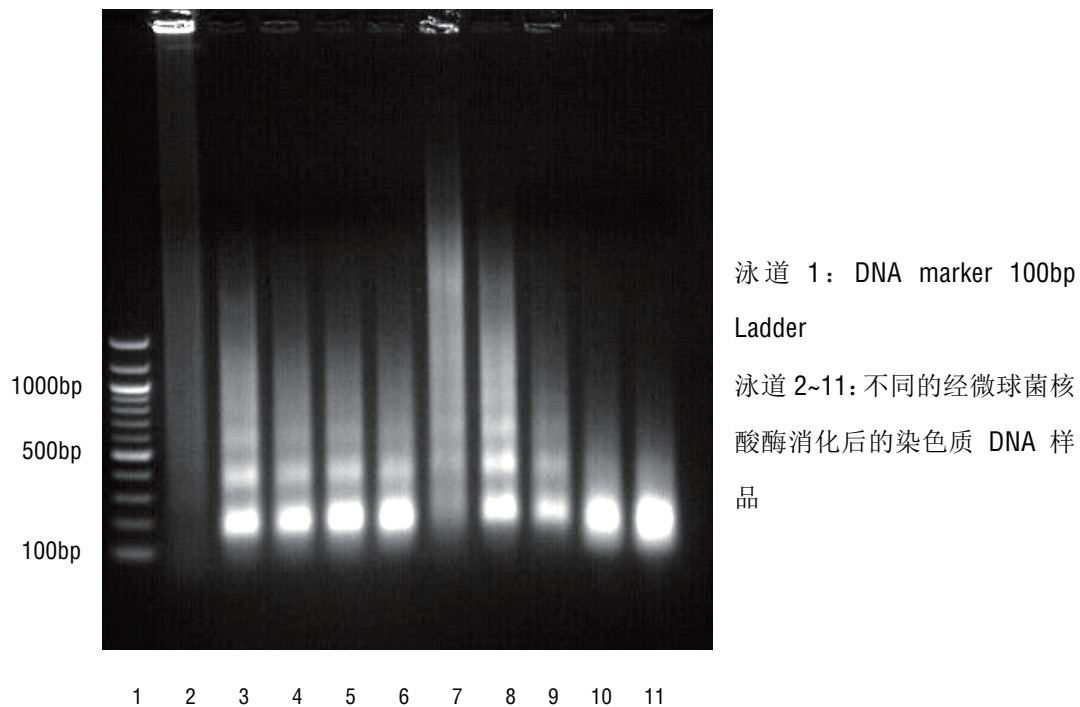
甲醛是常用的细胞固定剂，可造成蛋白质与DNA之间的共价交联，并且这种交联是可逆的。对于甲醛，要使用在有效期内、正确避光保存的分析级或分子生物学级别的甲醛（Formaldehyde，甲醛饱和水溶液，浓度37%），用培养基稀释到1%（即稀释37倍）。固定条件通常为室温固定10-15分钟，时间不宜过长，避免固定过度。甲醛的交联反应通过加入甘氨酸溶液终止。

2、 细胞核提取和染色质酶切

a)首先，细胞核提取和染色质切割所用的多种缓冲液均需要补加蛋白酶抑制剂（Protease Inhibitor Cocktail，PIC），且现配现加，新鲜使用。另外，细胞核提取缓冲液中还需要加入DTT，以保证后续染色质酶切的效率。

b)整个细胞核和染色质的提取过程需要在冰上操作。

c)染色质酶切后，一般需要对酶切的效率进行判断，方法如下：首先分出50ul的酶切后染色质，然后将染色质解交联，并利用纯化柱将解交联后的DNA进行纯化。取10 μ L纯化后的DNA样品，用1%琼脂糖凝胶电泳测定核酸片段大小（使用100bp DNA ladder作为Marker），消化后的DNA的理想长度约150-900 bp（1至5核小体DNA的长度，如下图4~6泳道所示），而消化过度将只能得到一条带（200bp左右，如下图10，11泳道所示），未充分消化的染色质DNA呈弥散状，或在高分子量区域和加样孔内仍然有DNA残留（如下图2，3，7，8，9泳道所示）。



d)为了保证酶切的最佳效率，通常需要进行滴定法确定微球菌核酸酶与染色质量的最佳比例，具体方法请参考CST官方网站的ChIP详细操作步骤。

<http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=resources-protocols>

e)合适的染色质DNA浓度，对于后续的免疫沉淀和DNA检测是非常关键的，因此我们推荐将酶切后的染色质DNA，取出部分经解交联和纯化后，进行DNA浓度测定。具体方法：纯化的DNA进行50倍稀释，然后测定OD260吸收值。DNA浓度=OD260吸收值×2500，理想的浓度应在100~200 μg/ml。

3、染色质免疫沉淀

a)所有染色质免疫沉淀使用的缓冲液和洗涤液都需要补加蛋白酶抑制剂（PIC）。

b)所有染色质免疫沉淀步骤都必须低温（冰上或4° C）操作

c)进行一次标准的染色质免疫沉淀，每一个实验组（如同一药物处理不同时间点的样品）需要分别设置目的蛋白管、input样品管、阴性对照管和阳性对照管（最好设置一个）。

◆ 目的蛋白管：进行一次标准的染色质免疫沉淀，需要5-10ug酶切后的交联染色质（此样品量指染色质中DNA的含量，按照上述2.e部分的描述进行DNA浓度测定后确定），用ChIP

缓冲液稀释后（通常稀释4倍，稀释后的ChIP体系不得小于500ul）进行，首先，从稀释后的目的蛋白管中取2%体积的染色质作为input管样本，不进行免疫沉淀反应，暂时保存在-20度（等待后续其他样品免疫沉淀步骤完成后，一起进行解交联和DNA纯化）。然后，在剩余的样品管染色质中加入对应的ChIP抗体，加入的抗体量一般在1~5 µg，不宜加入过多的ChIP抗体，对于CST抗体，一般加入10ul即可。

- ◆ **Input管：**每个实验组分出的Input样品作为组内参照DNA，要与经过不同ChIP抗体免疫沉淀后捕获的对应DNA样本一起完成解交联和DNA纯化后，通过测定（如定量PCR）进行比较，计算ChIP沉淀的效率。
- ◆ **阴性对照管：**一般可以取ChIP缓冲液稀释后的目的蛋白管相同含量的染色质作为阴性对照管样本，然后加入正常同型IgG抗体（例如，目的蛋白管所用的ChIP抗体如果为兔抗，此时就需要用正常兔IgG，加入正常兔IgG抗体量与目的蛋白的ChIP抗体量相同）。
- ◆ **阳性对照管：**一般可以取ChIP缓冲液稀释后的目的蛋白管相同含量的染色质作为阳性对照管样本，然后加入与目的蛋白的ChIP抗体量相同的H3组蛋白抗体或者RNA polymerase II 抗体，进行后续沉淀反应。阳性对照管选择的抗体，常常在整个染色质结合位点丰富，用于检测实验操作是否正确，对于初次进行ChIP实验的操作者推荐使用。

上述各样品管加入抗体后，用封口膜封紧管盖，在4° C的转子上（可置于翻转摇床上，转速100~150）孵育4小时以上或过夜。

注意：ChIP抗体的特异性对于ChIP结果至关重要，决定了ChIP数据的质量和可信度。而CST生产的ChIP抗体多数是兔单抗，相比传统多克隆抗体（pAb）和鼠单抗，特异性会大大提高，同时也保持了最高的亲和力，保证了ChIP数据的高质量和ChIP DNA富集的高效性。相关内部检测数据，请参看<http://www.cst-c.com.cn/resources.html>和相关博文《你看到的组蛋白修饰是不是真的？》获取。

然后加入30 µl的ChIP级蛋白G微珠（强烈推荐CST的#9006磁性微珠，便于操作），在4° C的转子上孵育2小时。注意：微珠要选择ChIP专用的、使用BSA和鲑精DNA封闭后的微珠，CST提供的产品为ChIP-Grade Protein G Agarose Beads (blocked with BSA and sonicated salmon sperm DNA) #9007。微珠一般保存在一定的缓冲液中，由于静置时会沉在底部，在吸取前一定要充分摇匀。微珠一般直径较小，建议使用200 µl的枪头，并将前端0.5cm减去并用酒精灯烧圆，防止在吸取时刮伤微珠表面。

4、漂洗沉淀后的染色质

充分漂洗对于降低非特异性吸附在微珠上的染色质是非常重要的,因此建议利用低盐和高盐洗涤液多次洗涤。每次洗涤后要将管内的上清尽量吸干,对于磁性微珠就很容易做到。但是琼脂糖微珠由于是通过离心沉于管底,在吸取上清时要格外注意,防止吸走微珠而造成损失。

5、ChIP DNA的洗脱和纯化

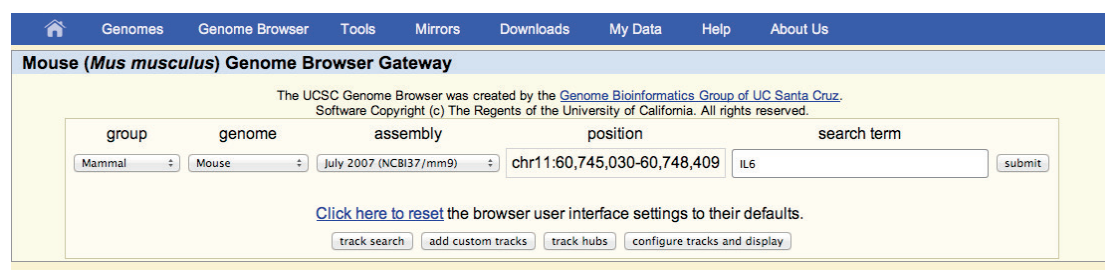
对于ChIP DNA的洗脱和纯化,严格按照CST ChIP操作步骤进行即可。但注意,在洗脱步骤完成后吸取洗脱上清时要格外注意,防止吸走微珠而造成样品污染。同时要注意每个样品管吸取等量的上清,防止造成样品间误差。

6、利用定量PCR对各组ChIP DNA进行检测和富集效率分析

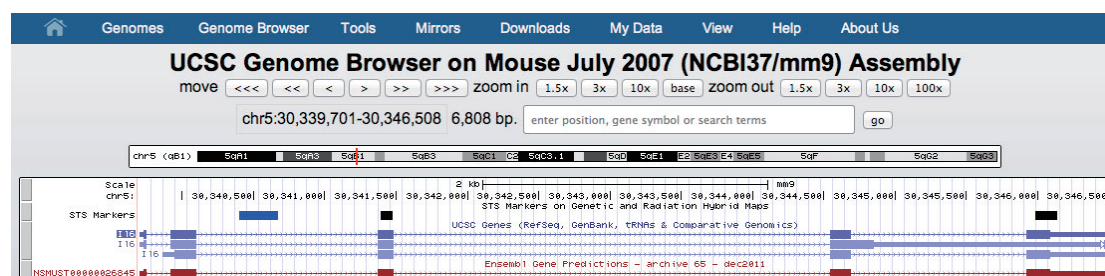
◆ ChIP引物的设计

首先要选定某一个基因的启动子区域,可以利用UCSC genome Browser

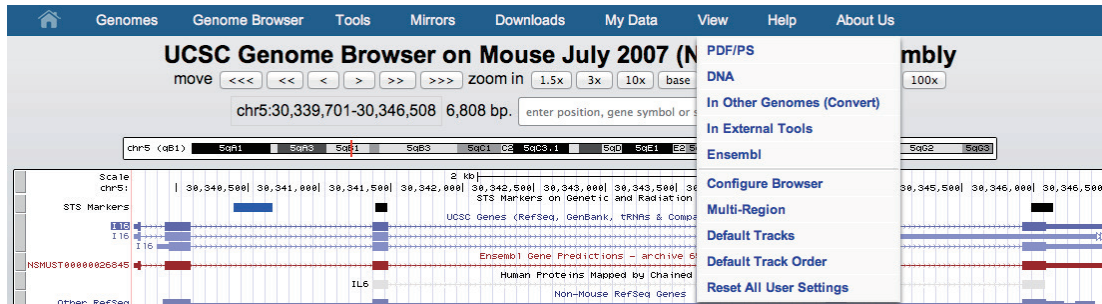
<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>进行分析。在genome框中选择种属,如小鼠,然后在对话框内,输入基因名称(如IL6),如下图所示,



点击submit, 网页跳转后如下图所示



然后，点击View，弹出下拉菜单后，点击DNA



网页跳转后如下图所示：

Get DNA for

Position

Note: This page retrieves genomic DNA for a single region. If you would prefer to get DNA for many items in a particular track, or get DNA with formatting options based on gene structure (introns, exons, UTRs, etc.), try using the [Table Browser](#) with the "sequence" output format.

Sequence Retrieval Region Options:

Add extra bases upstream (5') and extra downstream (3')

Note: if a feature is close to the beginning or end of a chromosome and upstream/downstream bases are added, they may be truncated in order to avoid extending past the edge of the chromosome.

Sequence Formatting Options:

☒ All upper case.
☐ All lower case.
☐ Mask repeats: ☒ to lower case ☐ to N
☐ Reverse complement (get '-' strand sequence)

然后在Sequence Retrieval Region Options选项下，Add后填写入要额外延长的DNA长度，（对于位于正链的基因，即从5'向3'转录的基因，转录方向箭头向右，向第一个数字框内输入2000；对于位于负链的基因，即从3'向5'转录的基因，转录方向箭头向左，向第二个数字框内输入2000；作为一般基因的启动子区域），然后点击网页最下方的extended case/color options按钮，网页跳转后如下图所示，

Extended DNA Case/Color

Extended DNA Case/Color Options

Use this page to highlight features in genomic DNA text. DNA covered by a particular track can be highlighted by case, underline, bold, italic, or color. See below for details about color, and for examples. Tracks in "hide" display mode are not shown in the grid below.

Position Reverse complement ☐

Letters per line Default case: ☒ Upper ☐ Lower

Track Name	Toggle Case	Underline	Bold	Italic	Red	Green	Blue
Conservation	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Mouse mRNAs	☐	☒	☐	☐	☐	☐	☐
Publications	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
RepeatMasker	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
STS Markers	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
UCSC Genes	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Ensembl Genes	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
SNPs (128)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Spliced ESTs	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Human Proteins	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Other RefSeq	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
RefSeq Genes	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Chromosome Band (ideogram)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

勾选Mouse mRNA选项后，点击submit按钮按钮，网页跳转后如下图所示：



```
>chr5:30337701-30346508
ACTTAAAAAGCACCTTTTAAAAAACTAAAAACAGAAATCTGAATGTTGTAGTAAGTGT
AACAACTCTTAAGTTTATTTCAGTAATTTAAAAAAATTTGTTAAGCGGAGAAAAGAACTCTG
TACTAACAGAGGCTGAGAAAGCACACGGCAGGGAATAGGGGAAATGGCTTCCCTTCATTG
CTGGACACAGACTGAGCTCCAGGCTGTTTCAGCTGCCTTTTAAAGGCTCAAGGGCACTAA
AAGTAAAACCATCCTGCTTCTCTCCCATTTTCATTTTCACCTAAAAATCCCTAGTCCC
TTTGTGAAGACCGGGCTTCACACGGTGAAAGAAATGGTGGACTCACTTCTTTCAATAGGC
TGACCTAGTATGTACACTAAGTCCACCCATGTTTAACTTCTCTCTAGTTTATTCCTCCT
TCTGATTTCTTCACAGAATCAACCGGCTTTTCATTTTAACTACTCTAATCGCCTGTGT
GTTTACACTGGGTACATCTTTAGAGTGACTTATATCTCCTTTTGCATTCTCAATAT
AAATTAATCTGCTAGATATAAGCTGTTCTCTTTATTTTAGTGTAATTTTTTCTTCACA
TTGAATCTTAGGAGAACTATGCTAGTGATATAAATCTTGAACATATAACATGGGAG
CATAAGAAAACAAGAACTCTTAAGGCAATCTGCAGAGTGAAGAAGCTGATTGTGATCCTGA
GAGTGTGTTTTGTAAATGGTTTTGGATTTATGTACAGAGCCTACTTTTCAGCCTGGAATC
ATTCTGAATGCTAGCTAGATATCTGGAGACAGGTGGACAGAAAACAGGAAGTAGTCTGA
AAAAGAACTAACCAAGGGAAGAAGTCTGTTTAAAGTTTGACCCAGCCTAGAAGACTGA
GCATTGGAGGGGTTATTTCAGAGTGAGACGTACCACCTTCAGATTCAAAATCCTGTCATCCA
GTAGAAGGGGAGCTTCAACACAAGCTAGCTAAGATACAATGAGGTCCTTCTTCGATATCT
TTATCTTCCATATACCAATCAAGAACTTCAACAACATGAGGACTGCAACAGACCT
TCAAGCCTCCTTGCATGACCTGGAAATGTTTTGGGGTGTCTTGGCAGCAGTGGGATCAGC
ACTAACAGATAAGGGCAACTCTCACAGAGACTAAAGGCTTAACTAAGAAGATAGCCAAAG
AGACCACTGGGAGAAATGCAGAGAATAGGCTTGGACTTGGAAAGCAAGATTGCTTGACAA
CAGACAGAAGATATTTCTGTACTTCAACCACTTTACCCACCTGGCAACTCCTGGAAACAA
CTGCACAAAATTTGGAGGTGAACAAACCATTAGAAACAACCTGGTCTTGACAAGACACAGG
AAAAACAAAGCAATATGCAACATTACTGTCTGTTGTCAGGTTGGGTGCTGGGGGTGGGAG
AGGGAGTGTGTCTTTGTATGATCTGAAAAAACTCAGGTCAGAACATCTGTAGATCCTT
ACAGACATACAAAAGAACTCTAGCCTCTTATTCATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG
TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG
AATAACATCAGCTTTAGCTTCTTCTCTCTTATAAAACATTTGGAATTTCAAGTTTCTT
TCCCATCAAGACATGCTCAAGTGTGAGTCACTTTTAAAGAAAAAAGAAAGAGTGCTCA
TGCTTCTTAGGGCTAGCCTCAAGGATGACTTAAGCACACTTTCCCTTCTCTAGTTGTGAT
TCTTTTCGATGTAAACGAGCTCACATTGTGCAATCTTAATAAGGTTTCCAATCAGCCCA
CCCCTCTGGCCCCACCCCAACCTTCAACAAAGATTTTATCAAATGTGGGATTTTCCC
ATGAGTCTCAAAATTAGAGAGTTGACTCCTAATAAATATGAGACTGGGGATGTCTGTAGC
TCATTCTGCTCTGGAGCCCAAGAAGCAGTAGTCAATTCAGAAACCGCTATGAAGTTC
CTCTCTGCAAGTAAGTGAAGGCAGTTCCTTGCCCTCTGGCGGAGCTATGAGACTGTGAG
AGAGGAGTGTGAGGCAGAGAGCCAGCATTTGCGGTGGCCAGCAGCCATCAGCTAGCAGC
AGGCGCCCACTGTGCTATCTGCTCACTTGCCGGTTTTCCCTTTTCTCCACGAGGAGAG
TTCCATCCAGTTGCCCTTCTTGGGACTGATGCTGGTGACAAACCGGCCTTCCCTACTTCA
CAAGTCCGGAGAGGAGACTTCACAGAGGATACCACTCCCAACAGACCTGTCTATACCACT
TCACAAGTCGGAGGCTTAATTACACATGTTCTCTGGGAAATCGTGGAAATGAGAAAAGAG
GTGGGTAGGCTGTGAAACTGATGAAGACCCAGTGTGGGCTCCATTCAATCTCTTTGCTC
TTGAATTAGAAATCTCTGCTGGGATCTAGGGCCCTTAGGATTTGAAGCTAAAGGTCAGA
```

然后选择划线序列前所有的2000bp序列作为启动子区域，利用引物设计软件（如DNAMAN、Primer Premier、NCBI primer design tools等），进行引物设计。引物要求：Tm值在60度左右，GC含量50%左右，扩增片段100-200bp，并利用NCBI的BLAST软件对上下游引物在基因组进行比对检验，初步确定无明显的非特异性匹配。然后，利用定量PCR仪，以稀释后的ChIP input作为模板，进行预扩增，通过观察溶解曲线确定无明显的非特异性扩增产物，特异的扩增曲线应该是只有一个PCR峰。另外，需要将事先分出的ChIP input DNA经过解交联和纯化后获得的精制DNA进行梯度稀释（即不稀释，1: 5，1: 25，1: 125），再分别扩增，获得不同的Ct值，以绘制标准曲线确定引物扩增效率。扩增效率如果较高，此标准曲线应该呈线性。

对于验证某个转录因子在某基因启动子区域的结合，常常需要首先确定转录因子的潜在结合位点，可以通过查阅文献、或用其他转录因子预测的软件（如TFSEARCH、TRANSFAC、ECR browser等）进行预测，然后确保设计的引物的扩增产物能够横跨这个预测的潜在结合位点。而对于组蛋白修饰（如Tri-Methyl-H3-K9）的ChIP实验，对引物的扩增范围要求则相对宽松，只要扩增产物能够位于启动子区域或基因转录区域即可。

为了方便大家使用，CST提供很多已经经过验证的检测多个基因的ChIP primer，请参考CST官方网站直接输入ChIP primer进行搜索或联系CST技术支持（4006-473-287）获取信息。

对于ChIP DNA的定量分析和计算，请参照CST ChIP详细操作步骤进行。

需要以解交联和纯化后2%的Input DNA（不稀释）、目的蛋白抗体IP后的DNA、IgG抗体IP后的DNA分别作为模板（各取未稀释的DNA 2ul），分别加入所要检测的目的基因对应的ChIP引物，进行定量PCR反应，并获得各自的Ct值。按照下面公式计算ChIP富集效率：

$$\text{Percent Input} = 2\% \times 2^{(C[T] \text{ 2\%Input Sample} - C[T] \text{ IP Sample})}$$

而IgG抗体IP后的DNA作为模板进行定量PCR反应获得的Ct值，作为阴性对照来衡量目的蛋白组的抗体富集是否达到显著差异，是否可以作为可信的结果。通常，当抗体对特定基因位点（例如转录因子结合到目标启动子）的富集相对于用相同抗体对非特定基因位点（例如相同转录因子结合到非目标启动子）的富集要高至少4倍，相对于用Normal Rabbit IgG #2729进行的特定基因位点的富集要高至少5到10倍时，我们定义ChIP结果为阳性。阳性ChIP实验可低至总input染色质的0.5%（例如转录因子和辅因子），高达总input染色质的40-50%（例如乙酰化和甲基化的组蛋白）。使用Normal Rabbit IgG #2729，我们磁珠和琼脂糖微珠的背景水平通常在染色质总input量的0.05 - 0.1%。

CST官方网站：www.cst-c.com.cn

CST官方网站的资源下载中心：<http://www.cst-c.com.cn/resources.html>

CST 技术支持：电话 4006-GreatQ(473-287)，邮箱 tech@cst-c.com.cn