染色质免疫沉淀

Chromatin Immunoprecipitation

姚艳，黄勋*

中国科学院遗传与发育生物学研究所，北京

*通讯作者邮箱: xhuang@genetics.ac.cn

引用格式 姚艳,黄勋. (2019). 染色质免疫沉淀. *Bio-101* e1010273. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010273.

How to cite: Yao, Y. and Huang, X. (2019). Chromatin immunoprecipitation. *Bio-101* e1010273. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010273. (in Chinese)

摘要: 染色质松紧状态会影响基因的表达水平，染色质修饰因子及转录因子可以与相关基因的启动子区域相结合，通过 ChIP (Chromatin immunoprecipitation) 以及 qPCR 可以检测其相互作用 (Yao 等, 2018)。

关键词: 果蝇，脂肪体，染色质免疫沉淀

材料与试剂

1. 移液枪头
2. 离心管
3. (可选) 过滤除菌器
4. 果蝇三龄幼虫
5. 多聚甲醛
6. 125 mM 甘氨酸
7. RNase A
8. 蛋白酶 K (20 mg/ml)
9. 琼脂糖珠子
10. PMSF
11. Protease Inhibitor Cocktail (Roche)
12. IgG (BioSS)
13. 抗体 (根据实验需要)
14. PCR 纯化试剂盒 (QIAGEN)

15. (可选) 无水乙醇
16. LiCl
17. NP-40
18. Sodium deoxycholate
19. EDTA
20. Tris-HCl, pH 8.0
21. SDS
22. NaCl
23. Triton X-100
24. KCl
25. Na₂HPO₄
26. KH₂PO₄
27. RIPA 裂解液 (见溶液配方)
28. RIPA 缓冲液 (含 350 mM NaCl) (见溶液配方)
29. 1× PBS 缓冲液 (见溶液配方)
30. TEL 缓冲液 (见溶液配方)
31. TE 缓冲液 (见溶液配方)
32. 洗脱缓冲液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 移液枪
2. 震荡仪
3. 超声破碎仪
4. 冷冻离心机
5. -80 °C 冰箱
6. -20 °C 冰箱
7. 旋转摇床
8. 金属浴锅
9. 高压蒸汽灭菌

实验步骤

本实验流程如下：

1. 样品制备

- 1.1 在预冷的磷酸盐缓冲液 PBS (含有 1 mM PMSF 和 Protease Inhibitor Cocktail, Roche) 中解剖 50 只果蝇三龄幼虫的脂肪体。
- 1.2 把解剖好的脂肪体放入装有 200 μ l 预冷的 PBS (含有 1 mM PMSF 和 Protease Inhibitor Cocktail, Roche) 的 1.5 ml 的离心管中, 并加入多聚甲醛使其终浓度为 1%, 37 °C 交联 15 分钟。交联期间每 5 分钟用振荡仪振荡一下。
- 1.3 加入终浓度为 125 mM 甘氨酸, 室温孵育 2 分钟终止交联反应。
- 1.4 终止反应后, 用预冷的 PBS (含有 1 mM PMSF 和 Protease Inhibitor Cocktail, Roche) 洗 2 次。
- 1.5 加入 350 μ l 的 RIPA 裂解液并充分匀浆, 然后用超声破碎仪将染色质打断成为 200~1,000 bp 的片段。超声条件因仪器的不同而不同。如使用 Ultrasonic Homogenizer 4710 series (Cole-Parmer Instrument Co. Chicago, USA), 超声条件为: Duty Cycle 30%, Output Control 2, 超声时间 10 秒, 间隔时间 1 分钟, 超声次数 12 次。这一步是该实验的关键步骤, 超声片段过大会严重降低共沉淀效率, 而片段过小会导致 PCR 难以检测。

- 1.6 超声后的样品，4 °C 条件下，15,000 × *g* 离心 15 分钟，去除细胞碎片和脂类物质。
- 1.7 离心后，留上清进行下一步染色质免疫沉淀实验，或者冻于-80 °C 备用。
2. 染色质免疫沉淀
 - 2.1 从制备好的样品中取 10%作为 Input，-20 °C 储存。其余样品平均分成两份，分别加入等量的 IgG (BioSS) 和相应抗体，4 °C 旋转摇床孵育过夜。
 - 2.2 取被 Salmon Sperm DNA 封闭的 protein A 或者 protein G 的珠子各 20 μl，用 RIPA 裂解液洗三次。
 - 2.3 把与抗体或者 IgG 孵育过夜的样品加入预处理完的珠子中，4 °C 孵育 2 小时。800 × *g* 离心 2 分钟，去除上清。
 - 2.4 依次用 1 ml 下列缓冲液清洗琼脂糖珠子：RIPA 缓冲液洗 2 次，每次 5 分钟；RIPA 缓冲液 (含 350 mM NaCl) 洗 2 次，5 分钟；TEL 缓冲液 (溶液配方 1) 洗 2 次，每次 5 分钟；TE 缓冲液 (溶液配方 2) 洗 2 次，每次 5 分钟。
 - 2.5 加入 150 μl 洗脱缓冲液 (溶液配方 3)，65 °C 金属浴 15 分钟，期间每 5 分钟振荡一次。800 × *g* 离心 2 分钟，吸取上清至新的 EP 管。再加入 150 μl 洗脱缓冲液重复处理一次，将两次得到的上清合并。
 - 2.6 把洗脱得到的 DNA 样品中加入 1 μl RNase A (10 mg/ml)，之前留下来的 input DNA 样品中加入 4 μl RNase A (10 mg/ml)，室温处理 2 小时。
 - 2.7 把洗脱得到的 DNA 样品中加入 1 μl 蛋白酶 K (20 mg/ml)，之前留下来的 input DNA 样品中加入 2.5 μl 蛋白酶 K，55 °C 金属浴处理 2 小时。65 °C 金属浴处理过夜解交联。
 - 2.8 解交联之后的 DNA 样品通过 PCR 纯化试剂盒 (QIAGEN) 或者无水乙醇沉淀回收，用于荧光定量 PCR 检测。纯化后的 Input DNA 1:50 稀释后，作为定量 PCR 检测的模板。

溶液配方

1. RIPA 裂解液 (不含抑制剂)
50 mM Tris-HCl, pH 7.4
1 mM EDTA

- 0.1% sodium deoxycholate
- 0.1% SDS
- 150 mM NaCl
- 1% Triton X-100
- 2. RIPA 缓冲液 (含 350 mM NaCl 但不含抑制剂)
 - 50 mM Tris-HCl, pH 7.4
 - 1 mM EDTA
 - 0.1% sodium deoxycholate
 - 0.1% SDS
 - 350 mM NaCl
 - 1% Triton X-100
- 3. 1× PBS 缓冲液
 - 137 mmol/L NaCl
 - 2.7 mmol/L KCl
 - 10 mmol/L Na₂HPO₄
 - 2 mmol/L KH₂PO₄

用 800 ml 蒸馏水溶解 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄ 和 0.24 g KH₂PO₄。

用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4, 加水至 1 L。分装后在 15 psi (1.05 kg/cm²) 高压蒸汽灭菌 20 min, 或过滤除菌, 室温保存
- 4. TEL 缓冲液
 - 0.25 M LiCl
 - 1% NP-40
 - 1% sodium deoxycholate
 - 1 mM EDTA
 - 10 mM Tris-HCl, pH 8.0
- 5. TE 缓冲液
 - 10 mM Tris-HCl, pH 8.0
 - 1 mM EDTA
- 6. 洗脱缓冲液
 - 10 mM Tris-HCl, pH 8.0
 - 1 mM EDTA
 - 1% SDS

250 mM NaCl

参考文献

1. Yao, Y., Li, X., Wang, W., Liu, Z., Chen, J., Ding, M. and Huang, X. (2018). [MRT, functioning with NURF complex, regulates lipid droplet size.](#) *Cell Rep* 24(11): 2972-2984.