

水稻染色质免疫共沉淀

翁小煜, 周少立, 宗伟, 欧阳亦聃*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: diana1983941@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 翁小煜, 周少立, 宗伟, 欧阳亦聃. (2018). 水稻染色质免疫共沉淀. *Bio-101* e1010135. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010135.

实验原理及目的: 染色质免疫共沉淀(Chromatin Immunoprecipitation, ChIP)是目前研究体内 DNA 与蛋白质相互作用最有效的方法之一。本实验的原理是在活细胞状态下通过化学交联剂将蛋白质-DNA 复合物固定, 并将其随机打断成一定长度范围内的染色质小片段, 然后通过免疫学的方法沉淀出目的蛋白质-DNA 复合体, 从而特异性地富集与目的蛋白相结合的 DNA 片段。通过对目的 DNA 片段的纯化与检测, 最终获得蛋白质与 DNA 相互作用的信息。染色质免疫共沉淀技术广泛的应用于表观遗传(组蛋白等)分析, 转录因子结合位点分析等蛋白质与 DNA 结合的实验分析中。随着第二代测序技术的逐步完善和成熟, 染色质免疫共沉淀结合第二代高通量测序技术(ChIP-seq)正逐步成为基因调控网络研究中一种非常有效的研究手段。

关键词: 染色质免疫共沉淀, ChIP, 蛋白质-DNA 互作

材料与试剂

1. 进口 1.5 ml 离心管和进口 50 ml 离心管
2. 面巾纸
3. 96 孔酶标板
4. 磁珠 (Protein A/G beads, Invitrogen, catalog numbers: 10002D, 10003D)
5. 幼嫩的水稻组织
6. 液氮
7. 肝糖原 (Glycogen, Invitrogen, catalog number: 00507460)
8. 乙醇
9. 甲醛 (Sigma, catalog number: F8775)

10. 2 M 甘氨酸
11. NaHCO₃ (Sigma)
12. 0.1 M PMSF (-20 °C) (Amresco, catalog number: M145-5G)
13. 100x Protease inhibitors (PIs, -20 °C) (Roche, catalog number: 11873580001)
14. 14.3 M β-ME (2-mercaptoethano, RT)
15. 20 mg/ml Proteinase K (-20 °C) (Fermentas, catalog number: EO0491) (Takara, catalog number: D9033)
16. 10 mg/ml RNase A (DNase-free, -20 °C) (Fermentas, catalog number: EN0531)
17. Tris saturated PHenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1) (RT) (Sigma-Aldrich, catalog number: P3803)
18. Chloroform (RT)
19. 3 M Sodium acetate (NaOAc, pH 5.2) (4 °C)
20. 20 mg/ml Glycogen (-20 °C) (Roche, catalog number: 10901393001)
21. 70% and 100% Ethanol (RT)
22. Antibody to be used for ChIP (-20 °C)
23. Protein A/G Dynabeads beads (4 °C) (Invitrogen, catalog number: 100.03D)
24. 0.5 M EDTA (pH 8.0, 4 °C)
25. 5 M LiCl (4 °C)
26. 1 M MgCl₂ (4 °C)
27. 5 M NaCl (RT)
28. 20% NP40 (Sigma, RT)
29. 10% SDS (RT)
30. 10% Sodium deoxycholate (上海生工分装, catalog number: 0613, RT)
31. 2 M Sucrose (4 °C)
32. 1 M Tris-HCl (pH 6.5 and pH 8.0, 4 °C)
33. 20% Triton X-100 (Sigma, catalog number: T8787, 4 °C)
34. Extraction buffer 1 (见溶液配方)
35. Extraction buffer 2 (见溶液配方)
36. Extraction buffer 3 (见溶液配方)
37. 2x Nuclei lysis buffer (见溶液配方)
38. Elution buffer (见溶液配方)
39. High salt wash buffer (见溶液配方)

40. LiCl wash buffer (见溶液配方)

41. 1x TE buffer (见溶液配方)

仪器设备

1. 超净工作台
2. 量筒
3. 研钵
4. 摇床
5. 漏斗
6. 移液枪
7. 冷冻离心机
8. 超声波仪 (Diagenode, model: UCD-200)
9. 真空泵
10. 振荡器
11. 静音混合器 (Qilinbeier, model: WH986)
12. 磁力架 (Dyna, Invitrogen bead separation)
13. 酶标仪
14. 滤膜 (膜布) Miracloth (Calbiochem, catalog number: 475855)
15. 水浴锅
16. -20 °C 冰箱
17. -80 °C 冰箱

实验步骤

实验之前:

在进行水稻染色质免疫共沉淀实验之前，首先需要确定：1)材料的取样时期和部位，2)需要用到的抗体。

对于水稻而言，过于老化成熟的组织会让甲醛交联过程难以奏效，应尽量避免使用；而选取幼嫩的组织 (如发芽后的幼苗，幼嫩的叶片或者幼穗等) 进行分析，可以使得甲醛充分浸润，提高交联效率，从而提高实验的成功率。

抗体的选择主要依据实验目的而定,如果是进行表观遗传修饰的分析,则可以根据实验需要选取H3K4, H3K27 等抗体;如果是分析转录因子的结合位点,则需要用到转录因子自身的特异性抗体或者与转录因子融合的标签抗体 (如HA, Flag, GFP等)

1. 实验材料的交联处理 (室温)

1.1 取幼嫩的水稻组织 (如发芽后的幼苗, 幼嫩的叶片或者幼穗等) 2 克左右, 将材料剪成尽可能的小的碎片装入 50 ml 离心管中, 加入 40 ml 灭菌 ddH₂O 清洗一遍, 完全除去水分, 加入含 1%甲醛的 Extraction buffer 1 (见溶液配方 1), 即交联液 30 ml, 真空交联 15-30 min。

注:

- 1) 如果材料从田间或温室获得, 则先用 ddH₂O 清洗干净, 并用面巾纸吸干水分。
- 2) 为防止样品在交联过程中漂浮起来, 可以用尼龙布或纱布将样品包好, 或者用其他策略确保样品在交联过程中完全浸润在交联液中。
- 3) 交联的时间是实验成败的关键因素之一, 交联时间太短, 则交联不够充分, 难以沉淀到目的片段, 交联时间太长, 则容易产生过高的背景噪音。因此针对不同的实验条件和组织材料, 实验人员应对交联的时间进行摸索和调整。一般而言, 当交联的材料变得透明为宜。

1.2 交联完毕后加入 2 ml 2 M 甘氨酸使甘氨酸终浓度到达 0.125 M, 混匀之后将样品重新放入真空仪, 抽真空 5 min 终止交联反应。

注: 真空泵升压的时候, 应保持缓慢匀速, 避免箱内压力的剧烈变化。

1.3 反应结束后在离心管中加入 40 ml ddH₂O 将样品清洗三遍, 之后取出样品, 放在多层面巾纸之间, 尽可能的吸干水分, 之后将交联好的样品放入液氮中, 置于 -70 °C 保存(也可以直接进行下一步)。

注: 样品取出后要尽可能完全的除去水分, 以免影响后续的染色质抽提的过程。

2. 实验材料的染色质抽提 (冰上进行)

2.1 用 50 ml 的离心管量取 30 ml 的 Extraction buffer 1 (见溶液配方 1) 放在冰上预冷 (此为一份样品的量)。

2.2 取出交联好的样品, 用液氮充分研磨成粉末, 在 30 ml 预冷的 Extraction buffer

1 中加入 1.5 克样品粉末，盖好盖子，迅速摇匀，将离心管埋入冰中，将冰盒放在摇床上抽提 30 min 至均匀的悬浮液 (Video 1)。



Video 1. 液氮磨样及 30 分钟冰上孵育

2.3 将单层的膜布 (Miracloth) 至于干净漏斗之上，过滤样品悬浮液至新的 50 ml 离心管，换用双层的膜布 (Miracloth) 重复以上步骤 (Video 2)。



Video 2. 样品过滤

- 2.4 用 Extraction buffer 1 平衡离心管，4 °C 离心，4,000 x g，20 min。
- 2.5 离心结束后立即取出离心管，小心倒去上清，加入 1 ml Extraction buffer 2 (见溶液配方 2)，对准离心管壁的沉淀部分反复的轻柔吹洗，大约 10-20 次后将重悬液转移至 1.5 ml 离心管中。

注：在吹洗管壁沉淀的时候，注意保持 50 ml 离心管仍然在冰上。

2.6 4 °C 离心，16,000 x g，10 min。

2.7 用枪吸干上清，加入 500 μ l Extraction buffer 3 (见溶液配方 3) 在冰上重悬染色质沉淀。

注：

- 1) 此步骤中，得到的染色质沉淀应为白色或浅绿色，如果为深绿色，说明杂质较多，可以加入 1 ml Extraction buffer 2 重复第 2.6 步，直至得到纯净的染色质。
- 2) 由于 Extraction buffer 3 非常粘稠，因此在进行重悬的时候会比较困难，但是应小心避免产生气泡，少量的 PMSF 同样可以起到去除气泡的作用。

2.8 取一新的 1.5 ml 离心管，加入 500 μ l Extraction buffer 3，然后小心将第 2.7 步中的重悬液转移至其上 (Video 3)。



Video 3. EB3 梯度离心体系配制

2.9 4 °C 离心，16,000 x g，1 h。

2.10 离心好后用枪吸干上清，加入 400 μ l 2x Nuclear lysis buffer (见溶液配方 4) 至染色质沉淀中，重新在核裂解液中悬浮染色质。

注意：在重悬的过程中应注意避免气泡的产生。

3. 染色质的超声波片段化(冰上进行)

3.1 重悬之后，每个样品取 2 μ l 保存作为超声前的对照，然后用超声仪将样品片段化成合适大小的 DNA 片段。

注：本实验室超声仪的使用方法：

- 1) *Diagenode* 超声波仪准备及设置：添加 4 度冷水至仪器水位刻度线，将能量旋钮调整为最高级别 (High)，超声波时间设定为超声 30s、停顿 30s。
- 2) 将盛有样品的 1.5ml 离心管放于转子孔内固定，放于仪器中。
- 3) 开启超声波仪，仪器工作约 15 分钟左右，样品可打碎至 400-1,000bp 之间。工作约 30 分钟左右，样品可打碎至 200bp 左右 (见图 1)。

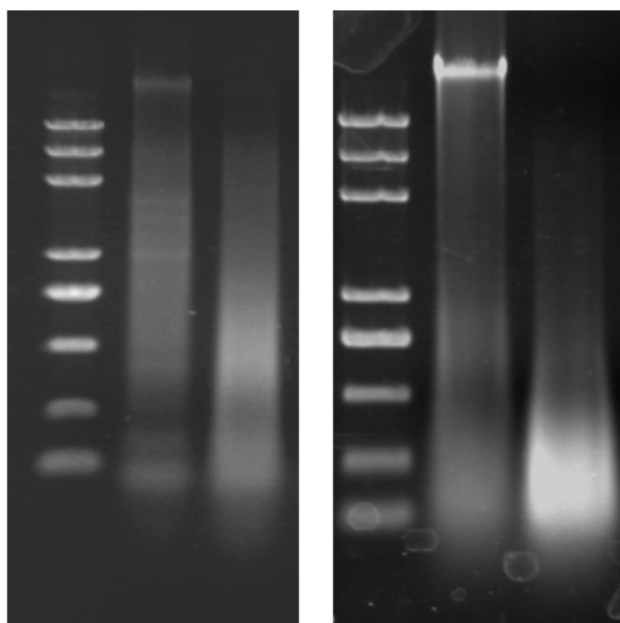


图 1. 不同超声时间下染色质的片段化范围

- 3.2 取 10 μ l 超声波片段化之后的染色质裂解液和超声前的 2 μ l 对照分别加入 500 μ l 灭菌 ddH₂O 和 20 μ l 5 M NaCl, 65 °C 水浴解交联过夜，剩下的染色质裂解液保存于 -80 °C 备用。
- 3.3 取出解交联产物，加入等体积的 25:24:1，手摇混匀 5 min, 16,000 x g 离心 10 min, 小心吸上清 480 μ l 左右至新离心管中，加入 100 μ l 3M NaAc, 900 μ l 预冷的无水乙醇和 2 μ l 肝糖原，置于 -70 °C 沉淀 1 小时以上或 -20 °C 沉淀过夜。
- 3.4 4 °C 离心, 16,000 x g, 20 min, 小心弃上清，加入 1 ml 70%乙醇洗沉淀一次，4 °C 离心 16,000 x g, 5 min, 小心弃上清，稍离心，用枪头小心吸干剩余残液，之后将离心管置于超净台上风干大约 15-30 min, 加入 15 μ l ddH₂O 溶解半小

时以上，用 1.5%-2%浓度的琼脂糖凝胶进行检测，若片段大小符合预期则进行下一步实验，如果片段过大，则可继续进行超声波处理。

4. 染色质前处理和免疫共沉淀(4 °C)

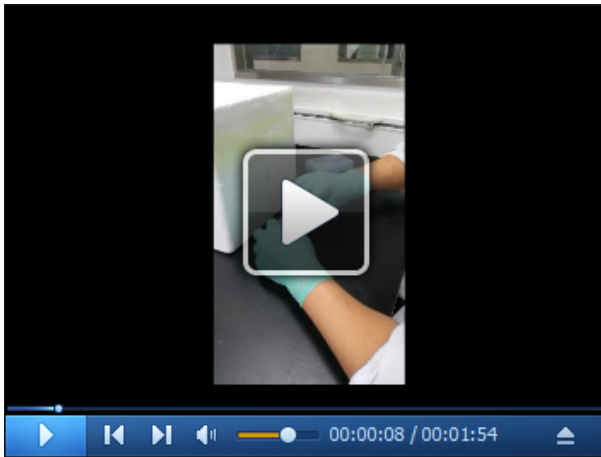
4.1 孵育抗体和磁珠 (Protein A/G beads) (Tube A'和 Tube B')

- 1) 取 1 ml 的 0.3x Nuclei lysis buffer 至 1.5 ml 离心管中，然后加入充分悬浮的 Protein A/G beads 80 μ l，在静音混合器上洗涤 10 min，4 °C，之后置于磁力架上 2 min，中间轻轻颠倒磁力架，使管盖上的磁珠重悬，打开盖子直接在磁力架弃管中液体，再用 1 ml 0.3x Nuclei lysis buffer 重悬，重复以上步骤三次 (Video 4)。最后用 1 ml 0.3x Nuclei lysis buffer 重悬。每个样品准备两管，分别标注为 Tube A'(Antibody)和 Tube B'(IgG or No-Antibody)。



Video 4. Beads 清洗方法

- 2) 在标记为 Tube A'的离心管中加入 5 μ g 抗体，在标记为 Tube B'的离心管中加入 IgG 或者不加抗体，将离心管置于 4 °C 静音混合器上，颠倒旋转孵育 5 h 或过夜，让抗体和磁珠结合 (Video 5)。



Video 5. 抗体添加及孵育

注：加入抗体的多少由抗体的效价，样品的多少等诸多因素决定。一般而言，每25 μg 的染色质 DNA 加入 5 μg 的抗体。实验者亦可根据实际情况进行增减。

4.2 染色质的预处理 (Tube A 和 Tube B)

- 1) 取 1 ml 的 0.3x Nuclei lysis buffer 至 1.5 ml 离心管中，然后加入充分悬浮的 Protein A/G beads 40 μl ，在静音混合器上洗涤 10 min，4 $^{\circ}\text{C}$ ，之后置于磁力架上 2 min，中间轻轻颠倒磁力架，使管盖上的磁珠重悬，打开盖子直接在磁力架弃管中液体，重复以上步骤三次。最后用 1 ml 0.3x Nuclei lysis buffer 重悬。每个样品准备两管，分别标注为 Tube A (Antibody)和 Tube B (IgG or No-Antibody)。
- 2) 取出 3.2 中保存在-80 $^{\circ}\text{C}$ 的片段化染色质溶液，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心，16,000 $\times g$ ，5 min，吸取 20 μl 上清作为 Input 对照。

注：此处可以取 10 μl 上清用于后续 western 检测的。

- 3) 将剩余的上清小心的平均转移到 4.2 1)中的 Tube A 和 Tube B 离心管中，将离心管置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 静音混合器上，孵育 1-6 小时以上，以消除背景。

4.3 免疫沉淀

- 1) 将 4.2 中的 Tube A，Tube B 和 4.1 中的 Tube A'，Tube B'同时置于磁力架上，2 min，用枪小心吸掉 Tube A'，Tube B'的上清，然后用枪小心将 Tube A，Tube B 中预处理的染色质溶液转移至对应的 Tube A'，Tube B'离心管中。

2) 将离心管置于 4 °C 静音混合器上，孵育 6 小时或以上。

5. 洗脱蛋白质-DNA 复合物并释放 DNA (4 °C)

5.1 孵育结束后，将离心管置于磁力架上，直接拿着磁力架弃管中上清，按顺序依次加入下列 washing buffer 各 1 ml，颠倒离心管让磁珠完全悬浮，然后将离心管置于磁力架上，2 min，直接拿着磁力架弃管中上清。

1) 0.5x Nuclei lysis buffer 一次快速，一次 5 min

2) High salt wash buffer 一次快速，一次 5 min

3) LiCl salt wash buffer 一次快速，一次 5 min

4) TE buffer 一次快速，一次 5 min

注：快速洗涤时仅需将磁珠完全重悬后即可立即放在磁力架上，第二次洗涤时，则需要将离心管置于静音混合器上，4 °C，洗涤 5 min，然后再将其放在静音混合器上，2 min。

5.2 最后一次 TE buffer 后完全吸干上清，加 250 μ l Elution buffer，65 °C 水浴 15 min，每隔 3 min 颠倒一次，之后将离心管置于磁力架上，2 min，中间颠倒磁力架数次，以将管盖上的磁珠重悬，小心吸取上清至新的 1.5 ml 离心管中。

5.3 重复 5.2，将两次的上清混合至同一离心管中。

5.4 取出 4.2.2) 中 -80 °C 保存的 Input 对照，加入 500 μ l ddH₂O，然后分别在 Input 和 5.3 中洗脱后的染色质中加入 20 μ l 5 M NaCl，65 °C 水浴，解交联六个小时以上。

6. 纯化 DNA (室温)

6.1 在解交联产物中加入 10 μ l 0.5 M EDTA，20 μ l Tris-HCl pH 6.5，2 μ l Proteinase K (20 mg/ml) 和 1 μ g RNase A，45 °C 水浴 1 小时。

6.2 取出离心管，加入等体积的 25:24:1，手摇混匀 5 min，16,000 x g 离心 10 min，吸上清 (480~500 μ l) 至新离心管中，加入 100 μ l 3 M NaAc，900 μ l 预冷的无水乙醇和 2 μ l 甘糖原，置于 -70 °C 1 小时以上或 -20 °C 过夜。

6.3 4 °C 离心，16,000 x g，20 min，小心弃上清，加入 1 ml 70% 乙醇洗盐，4 °C 离心 16,000 x g，5 min，小心弃上清，稍离心，用枪头小心吸干剩余残液，之后将离心管置于超净台上风干大约 15-30 min，加入 50 μ l TE buffer 溶解半小时以上。

6.4 用 Picogreen assay (Invitrogen Q-bit) 和 Agilent BioAnalyzer DNA 1000 chip (见图 2) 分别对 DNA 的浓度进行测定，之后样品置于-20 °C 保存或进行后续分析。

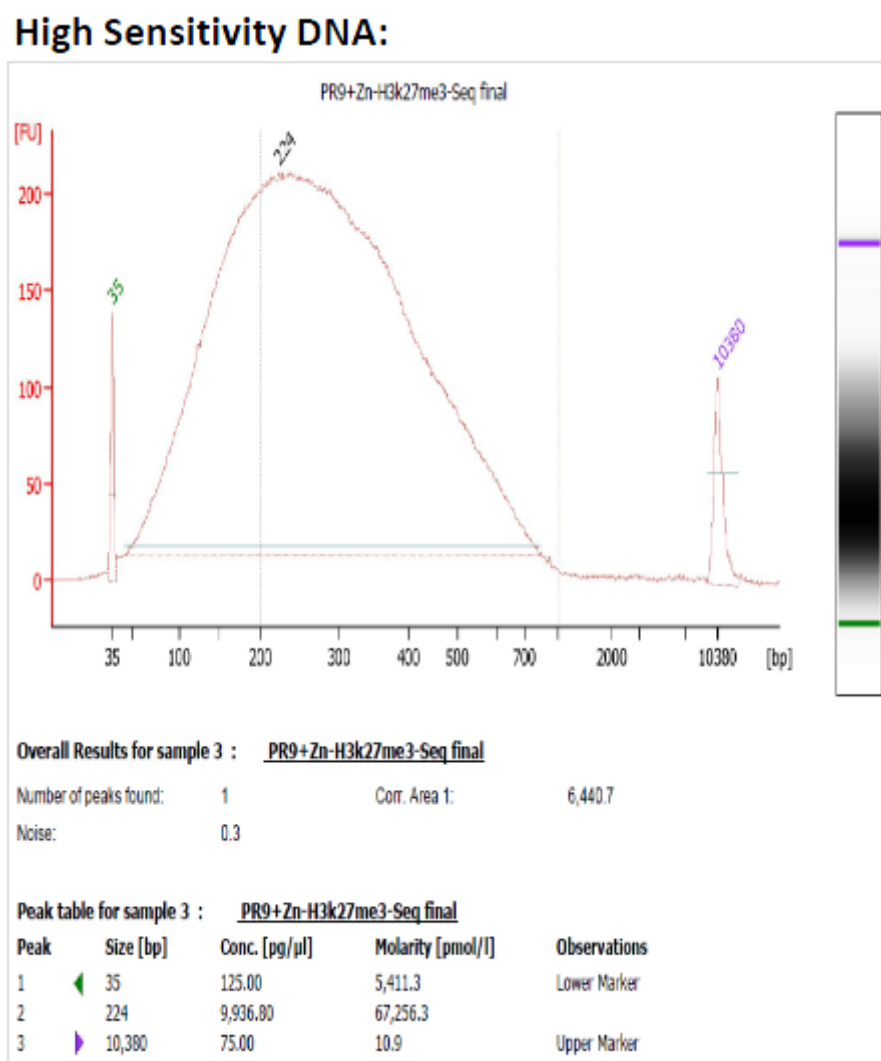


图 2. Agilent BioAnalyzer DNA 1000 chip 对 CHIP DNA 分析结果示意图

7. 用 Picogreen 对 CHIP DNA 进行定量

7.1 按如下表格在 96 孔酶标板中准备 DNA 标准品:

浓度	DNA	TE Buffer
空白	-	50 μ l
浓度	0.1 ng/ μ l DNA	TE Buffer
0.0025 ng/ μ l	2.5 μ l	47.5 μ l
0.005 ng/ μ l	5 μ l	45 μ l
0.01 ng/ μ l	10 μ l	40 μ l
浓度	1 ng/ μ l DNA	TE Buffer
0.025 ng/ μ l	2.5 μ l	47.5 μ l
0.05 ng/ μ l	5 μ l	45 μ l
0.1 ng/ μ l	10 μ l	40 μ l

7.2 取 1 μ l CHIP DNA 加入 49 μ l TE buffer，混匀。

7.3 用 1x TE buffer 稀释 20x picogreen 试剂。取 Aliquot 50 μ l 1x picogreen 至每个待测的孔中。

注：Input 至少稀释 10 倍，以保证其浓度落入标准品范围之内。

7.4 用酶标仪进行测定，测定模式 Fluorescence Top，Excitation wavelength: 485 nm，Emission wavelength: 535 nm，记录读数并计算 CHIP DNA 浓度。

溶液配方

1. Extraction buffer 1

Extraction buffer 1	for 100 ml, 4 °C
0.4 M Sucrose	20 ml of 2 M
10 mM Tris-HCl, pH 8.0	1 ml of 1 M
5 mM β -ME	35 μ l of 14.3 M
1 mM PMSF	100 μ l of 0.1 M
Protease inhibitors	two tablet (EDTA-free)
dd water	up to 100 ml

2. Extraction buffer 2

Extraction buffer 2	for 5 ml, 4 °C
0.25 M Sucrose	625 µl of 2 M
10 mM Tris-HCl, pH 8.0	50 µl of 1 M
10 mM MgCl ₂	50 µl of 1 M
1% Triton X-100	250 µl of 20%
5 mM β-ME	1.75 µl of 14.3 M
1 mM PMSF	5 µl of 0.1 M
Protease inhibitors	50 µl of 100x
dd water	4 ml

3. Extraction buffer 3

Extraction buffer 3	for 5 ml, 4 °C
1.7 M Sucrose	4.25 ml of 2 M
10 mM Tris-HCl, pH 8.0	50 µl of 1 M
2 mM MgCl ₂	10 µl of 1 M
0.15% Triton X-100	37.5 µl of 20%
5 mM β-ME	1.75 µl of 14.4 M
1 mM PMSF	5 µl of 0.1 M
Protease inhibitors	50 µl of 100x
dd water	600 µl

4. 2x Nuclei lysis buffer

2x Nuclei lysis buffer	for 1 ml, 4 °C
10 mM Tris-HCl, pH 8.0	50 µl of 1 M
20 mM EDTA	20 µl of 0.5 M
400 mM NaCl	100 µl of 10%
1% Triton X-100	
2 mM PMSF	1 µl of 0.1 M
Protease inhibitors	10 µl of 100x
dd water	820 µl

5. Elution buffer

Elution buffer	for 10 ml, RT
1% SDS	1 ml of 10%
0.1 M NaHCO ₃	0.084 g
dd water	up to 10 ml

6. High salt wash buffer

High salt wash buffer	for 20 ml, 4 °C
500 mM NaCl	2 ml of 5 M
0.25% Triton X-100	1 ml of 20%
2 mM EDTA	80 µl of 0.5 M
50 mM Tris-HCl, pH 8.0	400 µl 1 M
dd water	up to 20 ml

7. LiCl wash buffer

LiCl wash buffer	for 20 ml, 4 °C
25 mM LiCl	1 ml of 5 M
0.5 % NP-40	1 ml of 20%
0.25 % sodium deoxycholate	2 ml of 10%
10 mM Tris-HCl, pH 8.0	200 µl of 1 M
1 mM EDTA	40 µl of 0.5 M
dd water	up to 20 ml

8. 1x TE buffer

1x TE buffer	for 20 ml, 4 °C
10 mM Tris-HCl, pH 8.0	200 µl of 1 M
1 mM EDTA	40 µl of 0.5 M
dd water	up to 20 ml