

染色质免疫共沉淀 (ChIP)

染色质免疫共沉淀可以：（1）组蛋白修饰酶的抗体作为“生物标记”；（2）转录调控分析；（3）药物开发研究；（4）DNA 损失与凋亡分析。

1 实验方法原理：

在保持组蛋白和 DNA 联合的同时，通过运用对应于一个特定组蛋白标记的生物抗体，染色质被切成很小的片断，并沉淀下来。

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“prorein A”特异性地结合到免疫球蛋白的 FC 片段的现象活用开发出来的方法。

目前多用精制的 prorein A 预先结合固化在 argarose 的 beads 上，使之与含有抗原的溶液及抗体反应后，beads 上的 prorein A 就能吸附抗原达到精制的目的。

2 实验材料、试剂、仪器耗材：

细胞样品

甲醛、甘氨酸、PBS、SDS、Lysis Buffer、洗脱液、RNaseA、蛋白酶 K、omega 胶回收试剂盒等

离心管、超声仪、电泳仪、离心机等

3 实验步骤：

一、细胞的甲醛交联与超声破碎（第一天）

1. 取出 1 平皿细胞（10 cm 平皿），加入 243 ul 37%甲醛，使得甲醛的终浓度为 1%（培养基共有 9 ml）。
2. 37°C 孵育 10 min。
3. 终止交联：加甘氨酸至终浓度为 0.125 M。450 ul 2.5 M 甘氨酸于平皿中。混匀后，在室温下放置 5 min 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 15 ml 离心管中 (PBS 依次为 5 ml, 3 ml 和 3 ml) 。预冷后 2 000 rpm 5 min 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 200ul 含 2×10^6 个细胞。这样每 100 ul 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%。即为 4×10^6 个细胞。因此每管加入 400 ul SDS Lysis Buffer。将 2 管混在一起，共 800 ul。
7. 超声破碎：VCX750，25%功率，4.5 s 冲击，9 s 间隙。共 14 次。

二、除杂及抗体哺育 （第一天）

1. 超声破碎结束后，10 000 g 4℃离心 10 min。去除不溶物质。
2. 留取 300ul 做实验，其余保存于-80℃。
3. 300 ul 中，100 ul 加抗体做为实验组；100 ul 不加抗体做为对照组；100 ul 加入 4 ul 5 M NaCl (NaCl 终浓度为 0.2 M) ，65℃处理 3 h 解交联，跑电泳，检测超声破碎的效果。
4. 在 100 ul 的超声破碎产物中，加入 900 ul ChIP DilutionBuffer 和 20 ul 的 50×PIC。再各加入 60 ul ProteinA Agarose/SalmonSpermDNA。4℃颠转混匀 1 h。
5. 1 h 后，在 4℃静置 10 min 沉淀，700 rpm 离心 1 min。
6. 取上清。各留取 20 ul 做为 input。一管中加入 1 ul 抗体，另一管中则不加抗体。4℃颠转过夜。

三、检验超声破碎的效果 （第一天）

1. 取 100 ul 超声破碎后产物，加入 4 ul 5M NaCl，65℃处理 2 h 解交联。
2. 分出一半用酚/氯仿抽提。电泳检测超声效果。

四、免疫复合物的沉淀及清洗 （第二天）

1. 孵育过夜后, 每管中加入 60 ul ProteinA Agarose/SalmonSperm DNA。4°C颠转 2 h。
2. 4°C静置 10 min 后, 700 rpm 离心 1 min。除去上清。
3. 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°C颠转 10 min, 4°C静置 10 min 沉淀, 700 rpm 离心 1 min, 除去上清。

洗涤溶液:

- (1) low salt wash buffer-one wash
 - (2) highsalt wash buffer-one wash
 - (3) LiCl wash buffer-one wash
 - (4) TE buffer-two wash
4. 清洗完毕后, 开始洗脱。

洗脱液的配方: 100 ul 10%SDS, 100 ul 1M NaHCO₃, 800 ul ddH₂O, 共 1 ml。

每管加入 250 ul 洗脱 buffer, 室温下颠转 15 min, 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 ul。

5. 解交联: 每管中加入 20 ul 5M NaCl (NaCl 终浓度为 0.2 M) 。
6. 混匀, 65°C解交联过夜。

五、DNA 样品的回收 (第三天)

1. 解交联结束后, 每管加入 1 ul RNaseA (MBI) , 37°C孵育 1 h。
2. 每管加入 10 ul 0.5 M EDTA, 20 ul 1M Tris.HCl (PH6.5) , 2 ul 10 mg/ml 蛋白酶 K。
45°C处理 2 h。
3. DNA 片段的回收----omega 胶回收试剂盒。最终的样品溶于 100 ul ddH₂O。

六、PCR 分析 (第三天)

ChIP-chip 技术对于大规模挖掘顺式调控信息成绩卓著,同时它可以用于胚胎干细胞和一些疾病如癌症、心血管疾病和中央神经紊乱的发生的机制。研究人员还可以利用这项技术开发一些治疗方法。目前 ChIP-chip 技术研究主要集中于两个领域:及转录因子的结合和条件特异性;组蛋白的修饰,组蛋白修饰蛋白和染色体重建。

ChIP-chip 在描述转录结合因子动力学中的研究、染色体结构组分的分布、在组蛋白的修饰、组蛋白修饰蛋白和染色体重建中的应用也十分广泛。ChIP-chip 技术的优点是,可以在体内进行反应;在给定的检验细胞环境的模式下得到 DNA 相互关系的简单影像;使用特异性修正抗体鉴定与包含有一个特异性后转录修正的蛋白质的相关位点;直接或者间接(通过蛋白质与蛋白质的相互作用)的鉴别基因组与蛋白质的相关位点。缺点是:需要一个特异性蛋白质抗体,有时难于获得;为了获得高丰度的结合片段,必须实验演示胞内条件下靶标蛋白质的表达情况;调控蛋白质的基因的获取可能需要限制在组织来源中。

总之,ChIP-chip 技术的发展为析活细胞或组织中 DNA 与蛋白质的相互关系提供了一个极为有力的工具。在未来的研究中,将对芯片的构建进行改进,提高其实用性。使用易于获得抗体,增加这种方法的可用性。

在 PCR 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,大家也越来越倾向于 Q-PCR 了。此外还有一些由 ChIP 衍生出来的方法。例如 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,最后分析的时候需要先将 RNA 逆转录成为 cDNA);还有 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)。

4 注意事项:

1. 注意抗体的性质。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。建议仔细检查抗体的说明书。特别是多抗的特异性是问题。

2. 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的悲惨结果。

3. 为防止蛋白的分解，修饰，溶解抗原的缓冲液必须加蛋白每抑制剂，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。

5 其他：

一、染色质免疫共沉淀简介

真核生物的基因组 DNA 以染色质的形式存在。因此，研究蛋白质与 DNA 在染色质环境下的相互作用是阐明真核生物基因表达机制的基本途径。染色质免疫沉淀技术 (chromatin immunoprecipitation assay, CHIP) 是目前唯一研究体内 DNA 与蛋白质相互作用的方法。它的基本原理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，通过对目的片断的纯化与检测，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。

二、ChIP 的一般流程

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-片断---PCR 分析。