

染色质免疫沉淀后测序 (ChIP-seq)标准操作流程

目 录

实验所需试剂	3
第一章 ChIP 操作流程	6
第一部分：样品交联与样品制备	6
第二部分：细胞核抽提和染色质超声破碎	9
第三部分：分析染色质片段化情况及浓度 (推荐必做质控步骤)	11
第四部分：染色质免疫沉淀 (IP)	12
第五部分：染色质洗脱并解交联	14
第六部分：离心柱纯化 DNA	15
第七部分：qPCR 定量分析 ChIP 实验结果	16
第二章： DNA 建库流程	19
第一部分：Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2 试剂盒建库流程	20
第二部分：单链建库试剂盒操作流程	25
第三部分 文库 QC 和上机送样	29
第三章：数据分析流程	32
附录 1：优化超声条件	35
附录 2：常见问题及解决方案	36

实验所需试剂

以下1-14号试剂包含在Sonication ChIP Kit (RK20258) 中

1. Glycine Solution (10X) (甘氨酸溶液) (RM20700)

配制方法：将112.605g 甘氨酸 (glycine) 用1L 去离子水溶解得到1.5 M 甘氨酸溶液 (10X)

2. Cell swelling Buffer (10 X) (细胞裂解缓冲液) (RM20701)

- 250mM HEPES (pH 7.8)
- 15 mM MgCl₂
- 100mM KCl
- 1% NP-40

实验使用时将储存液稀释10倍，同时，需要使用前新鲜加入的组分包括：

- 1 mM DTT
- Protease inhibitor cocktail (100X)

3. ChIP Sonication Buffer (10X) (ChIP超声缓冲液) (RM20702)

- 0.5 M HEPES (pH 7.8)
- 1.4 M NaCl
- 10 mM EDTA
- 10% Triton X-100
- 1% Na-deoxycholate
- 1% SDS

实验使用时将储存液稀释10倍，同时，需要使用前新鲜加入的组分包括：

- Protease inhibitor cocktail (100X)

4. ChIP 低盐漂洗液 (10X) (Low Salt Wash Buffer) (RM20703)

- 1% SDS
- 10% Triton X-100
- 20 mM EDTA
- 200 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 1.5 M NaCl

实验使用时将储存液稀释10倍

5. ChIP 高盐漂洗液 (5X) (High Salt Wash Buffer) (RM20704)

- 0.5% SDS
- 5% Triton X-100
- 10 mM EDTA
- 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 2.5 M NaCl

实验使用时将储存液稀释5倍

6. LiCl (5X) 洗涤液 (RM20705)

- 1.25 M LiCl
- 5% NP-40
- 5% Sodium Deoxycholate
- 5 mM EDTA
- 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

实验使用时将储存液稀释5倍

7. TE 缓冲液 (100X) (RM20706)

- 1 M Tris-HCl (pH 8.0)
- 100 mM EDTA

实验使用时将储存液稀释100倍

8. ChIP 洗脱缓冲液 (ChIP Elution Buffer) (RM20707)

组分及最终工作浓度：

- 1% SDS
- 50 mM EDTA (pH 8.0)
- 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 50 mM NaHCO₃

9. 1 M DTT (RM20164)

10. 5 M NaCl (RM20708)

11. RNase A (10 mg/mL) (RM20709)

12. 蛋白酶K (20 mg/mL) (RM20713)

13. 抗体：组蛋白H3抗体 (RM20711)、CTCF抗体、H3K4me3抗体

14. IgG (RM20712)

15. ChIP级 蛋白A/G (Protein A/G, 1:1) 磁珠 (RM02915)
16. 蛋白酶抑制剂混合物PIC (100X) (RM02916)
17. 磁性分离架
18. 甲醛 (16%)
19. 乙醇 (96-100%) (80%乙醇需要现配现用)
20. 1X PBS
21. 无核酸酶水 (RM20234)
22. AFTSpin 多功能DNA回收纯化试剂盒 (离心柱型) (RK30100)
23. Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (RK21204)
24. Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2 试剂盒 (RK20255)
25. Scale ssDNA-seq Lib Prep Kit for Illumina V2 (10 pg-200 ng) 试剂盒 (RK20228)
26. 接头: Dual DNA Adapter 96 Kit for Illumina (RK20287)
27. Agilent High Sensitivity DNA Kit (Cat# 5067-4626), Agilent High Sensitivity DNA Reagents (reorder-no 5067-4627) for Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer
28. DNA 纯化磁珠: AFTMag NGS DNA Clean Beads (RK20257)
29. DNA 定量试剂盒: ABQubit 双链 DNA 定量试剂盒 (RK30140)

第一章 ChIP操作流程

第一部分：样品交联与样品制备

■ 组织样品

当收取组织样品进行 ChIP 实验时，要尽量去除脂类，以及坏死等无关组织。组织样品可直接进行交联处理，或置于干冰上稍后处理。为了获得最优的 ChIP 结果，推荐每个标准的 ChIP 反应需要约 25 mg 组织样品处理后获得的染色质。而因不同组织类型中的染色质含量有差异，为获得适量的染色质样品可根据预实验结果适当调整组织用量。注意：预实验时，需要额外准备约 5 mg 组织样品，进行染色质片段化效率和染色质浓度检测，并可作为 Input 内参对照。

在实际工作当中，我们建议每次实验处理足量的组织，可满足后续多个免疫沉淀反应和技术性重复要求，如单次 ChIP 实验应包含与阴性对照 (IgG)，阳性对照 H3 抗体和目的蛋白抗体等进行免疫沉淀的足量样品。您可根据自己的实验设计，在开始实验前计算所需要的 ChIP 反应次数，准备相应足量的组织或细胞。因此，我们建议以一个样品组为标准，准备约 100 到 150 mg 组织样品 (每个样品组能满足同时进行目的蛋白抗体、阴性对照 IgG、阳性对照 H3 抗体等多个 ChIP 反应的用量)。以下试剂计量按一个样品组计算。

实验前准备

- 取出并预热 100X 蛋白酶抑制剂混合物 PIC 和 10X 甘氨酸溶液，确保 PIC 完全溶解。
- 配制含 PIC 的 PBS。每个样品组 (100 到 150mg 组织) 准备 3 mL PBS (加入 30 μ L 100X PIC) ，置于冰上冷却。
- 配制 1X ChIP 细胞裂解缓冲液，每个样品组 (100 到 150 mg 组织) 准备 1 mL Cell swelling Buffer (1X) (细胞裂解缓冲液)
- 每个样品组 (100 到 150 mg 组织) 准备 28 μ L 37%的甲醛溶液，或 62.5 μ L 16%的不含甲醇的福尔马林溶液；置于室温，确保新鲜未过期。

具体实验步骤

1. 称取新鲜或冻存的组织样品，每个样品组需准备样品量：100 到 150 mg 组织。
2. 把样品置于 60 mm 或 100 mm 培养皿中，用解剖刀或剪刀剪碎成 1-2 mm 大小碎块。并保持样品一直处于冰上 或低温，避免蛋白降解。
3. 转移切碎的组织到 15 mL 的锥底离心管中。
4. 每个样品组中加入 1 mL 预冷的 PBS + PIC。

为了使蛋白与 DNA 交联,每个样品组 (1 mL PBS+PIC) 加入 28 μ L 37%的甲醛溶液,或 62.5 μ L 16%的不含甲醇的甲醛溶液(可根据样品量调整,保证甲醛终浓度为 1%即可)。室温下低速摇动不少于 10 min, 甲醛交联时间可以根据具体样本类型进行优化。**注意: 不要在高于 25°C 的环境内固定。**

针对检测组织样本的部分转录因子或转录辅因子, 我们建议可进行如下交联优化:

- 组蛋白或组蛋白修饰靶点, 推荐交联时间为 10 min 即可;
 - 对于转录因子转录辅助因子, 推荐交联时间交联时间为 10-15 min;
5. 向每个样品组 (1 mL PBS+PIC) , 加入 100 μ L 10X 甘氨酸溶液稍加转动使之混匀, 室温放置 5 min, 以终止交联反应。
 6. 4°C, 1,200 g 离心 5 min 收集固定后的组织样品。
 7. 去除上清后, 用 1 mL 预冷的 PBS+PIC 漂洗样品一次。
 8. 4°C, 1,200 g 再次离心 5 min。
 9. 重复 7 和 8 步骤各 1 次。
 10. 去除上清后, 重悬样品到 1 mL Cell swelling Buffer(1X) (细胞裂解缓冲液)+PIC 并置于冰上。
 11. 转移组织悬液到 Dounce 匀浆器或自动化匀浆设备, 把组织样品分解成单细胞悬液无组织块可见 (可以分出一小部分在光学显微镜下观察是否充分分解) 。
 12. 转移上清到离心管并立即进行后续的细胞核处理和染色质片段化处理 (参照第二部分) 。

■ 细胞样品交联与样品制备

为了获得最优的 ChIP 结果, 一个标准的 ChIP 反应需要约 4×10^6 个细胞处理后获得的染色质。在实际工作当中, 我们建议每次实验处理足量的细胞用于满足后续多个免疫沉淀反应和技术性重复要求, 如单次 ChIP 实验应包含与阴性对照 (IgG)、阳性对照抗体和目的靶标蛋白抗体等进行免疫沉淀的足量样品。您可根据自己的实验设计, 在开始实验前计算所需要的 ChIP 反应次数, 准备相应足量的组织或细胞。因此, 我们建议以一个样品组为标准, 准备约为 1×10^7 到 2×10^7 细胞 (以 293T 细胞为例, 一般情况下, 大约对应于细胞生长汇合度在 80-90% 的 2-3 个 10 cm 培养皿的细胞) 。

注意: 以下试剂计量为一个样品组计算, 此足量细胞数能满足包括低染色质含量的细胞在内的各类细胞的 ChIP 实验, 同时染色质量适宜进行超声片段化处理。

注意: 建议在开展正式实验前, 先进行预实验, 以熟悉实验体系 and 了解并优化所用样本的各项条件。

预实验时, 需要额外准备一个细胞样品组, 对染色质剪切效率和浓度进行检测 (参照第三部分) 。另外, 为了细胞计数, 可额外准备一盘细胞用于血球计数板法测定细胞数。

实验前准备

- 足量培养的细胞 (请根据自己的实验需求, 计算所需要的 ChIP 反应次数和培养细胞量) 。
- 取出并预热 100X 蛋白酶抑制剂混合物 PIC 和 10X 甘氨酸溶液, 确保 PIC 完全溶解。
- 准备预冷的 PBS, 用于洗涤细胞。

- 配制含 PIC 的 PBS，用于刮下和收集细胞。每个培养皿需要 2 mL PBS (加入 20 μ L 100X PIC) ，置于冰上冷却，每个培养皿需准备足量普通 PBS，并置于冰上以备洗涤所用。
 - 用 PBS 新鲜配制终浓度为 1% 的细胞固定液。一般试剂盒标配为 16% 的不含甲醇的甲醛溶液 (可根据比例折算需要加的体积) ；甲醛溶液置于室温，确保新鲜未过期。
 - 配制 1X ChIP 细胞裂解缓冲液+PIC：
 - 每个样品组 (1X 10^7 到 2X 10^7 细胞) 准备 1 mL Cell swelling Buffer (1X) (细胞裂解缓冲液) (0.1mL Cell swelling Buffer 储存液 (10X) +0.9 mL ddH₂O +10 μ L 100X PIC+1 μ L DTT) ，置于冰上冷却。
1. 为了使蛋白与 DNA 交联，向每个培养皿加入新鲜配好的细胞固定液 (终浓度为 1%的含甲醛的 PBS) 10mL 后，室温 (15-25°C为宜) 放置 10 min。 **注意：不要在高于 25°C的环境内固定。**
 2. 在每个培养皿中加入 1mL 10X 甘氨酸溶液稍加转动使之混匀，室温孵育 5 min，来终止上述固定反应。
 3. 对于悬浮细胞：
 - a. 建议首先在培养时就确定好培养基的体积，根据培养基体积折算需要加入的 16% 甲醛的体积。然后加入折算体积的 16% 甲醛，混匀后直接在室温进行固定。

注意：加入甲醛前，确保培养基恢复到室温，千万不可立刻加入甲醛。

 - b. 收集固定后的细胞到 50 mL 锥底离心管中，4°C，1,000 g 离心 5 min 沉淀细胞后，用冰冷的 PBS 漂洗两次。
 - c. 4°C，1,000 g 离心 5 min 收集细胞，去除上清。 **(注意：此处可暂停实验，吸干上清后的细胞样品可保存在-80°C 冰箱)**
 - d. 若继续实验，每 2X 10^7 细胞重悬于 1 mL 1X ChIP 细胞裂解缓冲液+PIC 中，立即进行后续的细胞核抽提和染色质超声破碎阶段实验 (见第二部分)
 4. 对于贴壁细胞：
 - a. 弃去培养基后用冰冷的普通 PBS 5 mL 漂洗细胞两次，每次彻底弃净 PBS。
 - b. 每个培养皿的细胞加入 2 mL 冰冷的含 PIC 的 1X PBS，将细胞刮下，并将所有刮下来的固定后细胞收集到一个 15 mL 的锥底离心管中。
 - c. 4°C，1,000 g 离心 5 min 收集细胞，去除上清。 **(注意：此处可暂停实验，吸干上清后的细胞样品可保存在-80°C 冰箱)**
 - d. 若继续实验，每 2X 10^7 细胞重悬于 1 mL 1X Cell swelling Buffer (细胞裂解缓冲液) +PIC，立即进行后续的细胞核抽提和染色质超声破碎阶段实验(见第二部分)

第二部分：细胞核抽提和染色质超声破碎

注意：以下的操作流程所需的试剂用量是针对一个样品组（100 到 150 mg 组织，或 1×10^7 到 2×10^7 细胞）给出所需试剂用量。我们建议同一样品组内的多管样品(用于不同抗体的 ChIP 沉淀反应需要)染色质处理过程可合并至一管进行，这有利于得到均一的染色质超声片段，使用者需根据每组需要的 ChIP 反应总数调整试剂用量。

实验开始前准备：

- 取出并预热 200X 蛋白酶抑制剂混合物 PIC，确保 PIC 完全溶解。
 - 配制 1X Cell swelling Buffer(细胞裂解缓冲液)+PIC：每个样品组准备 2 mL 1X Cell swelling Buffer(细胞裂解缓冲液)，即 0.2 mL 10X Cell swelling Buffer(细胞裂解缓冲液)+ 1.8 mL ddH₂O + 20 μ L 100X PIC + 2 μ L DTT。
 - 配制 ChIP 超声缓冲液+PIC：每个样品组准备 1 mL ChIP 超声缓冲液+10 μ L 100X PIC。
1. 重悬来自第一部分的每个样本组到预冷的 1 mL 1X Cell swelling Buffer(细胞裂解缓冲液)+ PIC 中，冰上孵育 10 min，每 3 min 颠倒混匀一次。
 2. 4°C，5,000 g 离心 5 min 以沉淀细胞核，去掉上清。
 3. 再次将每个样品组沉淀重悬在预冷的 1 mL 1X Cell swelling Buffer(细胞裂解缓冲液)+ PIC 中，冰上孵育样品 5 min。
 4. 4°C，5,000 g 离心 5 min 以沉淀细胞核。将沉淀用 1 mL 或 500 μ L ChIP 超声缓冲液+PIC 再次重悬，冰上孵育 10 min。
 5. 最终将此样品转移到一个适宜超声的离心管中（根据不同实验室所使用的超声仪选择对应建议的离心管，如下表 1 所示），**注意：交联的组织或细胞样品可能仍处于非完全裂解状态，直到超声处理才能完全释放染色质。**

表 1：染色质超声破碎建议配套离心管、超声体积及超声功率

超声仪类型	建议使用离心管	建议超声体积(μ L)	建议超声功率(W)
接触式探头超声仪	2 ml 体积离心管	500-1000	50-100(需摸索)
非接触式(循环降温冰水浴) 超声仪	1.5 ml 体积薄壁管(查阅超声仪说明书推荐品牌及货号)	300-500	50-100(需摸索)
	0.2 ml 体积薄壁管(查阅超声仪说明书推荐品牌及货号)	50-150	50-100(需摸索)

6. 超声处理染色质片段

注意：超声条件需根据超声仪器的超声功率和超声间隔时间等进行优化：一般来说，优化后的超声条件需要能够将 60%到 90%的染色质片段随机打断到 1kb 以下。延长样品交联时间或交流温度过高，会显著降低染色质超声破碎效率。另外，过度超声会破坏染色质上抗原表位，导致抗体富集效率降低引起的 ChIP 扩增信号下降等问题。因此，我们建议用超声处理样品时，使用可得到理想染色质片段的最少超声循环数即可。如果发现延长超声时间，也始终无法达到理想的破碎后染色质范围，建议重新制备样品。

- 根据表 1 建议的超声体系：将待超声的细胞核样品重悬到合适体积的 ChIP 超声缓冲液中。

注意：超声体积过大或浓度过高，会导致染色质片段化效率降低。有实验室为了追求效果，会将一个样品分成多管超声后再合并进行后续实验。

- 使用接触式探头超声仪进行超声破碎：建议使用 3 mm 或 2 mm 直径微探头，设置 50% 以下振幅(需要摸索)，超声 2 s，间隔 2 s 的超声循环(使用者也可以根据自身需要设定每次超声的时间、间隔时间和循环次数)，事先摸索超声条件和时间运行。然后根据摸索好的超声条件和时间进行染色质样品超声破碎，可获较理想的染色质片段化样品。在超声过程中，需保持样品一直处于冰上低温状态。不要使探头接触超声管底部或管壁，如超声过程产生泡沫，需暂停超声并调整超声管位置。
 - 使用非接触式(循环降温冰水浴)超声仪进行超声破碎：根据仪器说明书，根据待超声样品体积设定合适功率(一般 500 μ L 以下样品，功率可以设定在 50-100 W 之间)，设定合适的超声循环和总运行时间。同样建议每次 ChIP 超声实验前，针对不同样品预先摸索超声条件和超声时间，可以做几个运行时间梯度(如 1min, 2min, 3min, 4min, 5min...)。一次超声(on)的时间，建议 10 s 以内，间隔时间通常建议不少于 10 s。有一个参考条件：超声 10 s，间隔时间 20 s，运行总时间：12 min(对应于 1×10^7 细胞样品)。
7. 超声破碎完成后，4°C，12,000 g 离心 10 min，除去样品中的细胞核碎片和其他不溶物。
 8. 将上清转移到一个新管子中，即为交联的染色质样品，充分混匀后取 50 μ L 染色质样品用以分析 DNA 分子量分布范围并确定其浓度(参照第三部分)，其他剩余染色质样品在下一步正式进行 IP 步骤前需要保存在-80°C 冰箱。

第三部分：分析染色质片段化情况及浓度 (推荐必做质控步骤)

1. 向来自第二部分第 8 步的 50 μL 染色质样品添加 100 μL 无核酸酶的水，补足到 150 μL ，然后加入 6 μL 5 M NaCl 和 2 μL RNase A，涡旋震荡混匀，37°C 孵育 30 min。
2. 向 RNase A 消化后的样品中加入 2 μL 蛋白酶 K，涡旋震荡混匀，65°C 孵育至少 2 hr。
3. 利用离心柱式 DNA 纯化试剂盒说明书进行 DNA 样品纯化后，取 10 μL 样品与 DNA marker 同时进行 1% 琼脂糖凝胶电泳以确定 DNA 片段大小。如果后续 ChIP 后 DNA 通过测序进行分析，理想的染色质需要有约 60-90% DNA 分子量范围在 200-500 bp；如果后续 ChIP 后 DNA 仅用于 qPCR 分析，可以适当放宽上述条件。
4. 用 DNA 浓度测定仪(如 Nanodrop)测定纯化后 DNA 浓度，理想的 DNA 浓度应当在 50-200 ng/ μL 之间。

注意：要得到理想的 ChIP 结果，合适长度和浓度的染色质样品至关重要。过度超声可能会减弱 PCR 定量信号。而超声不足可能会导致过高的背景信号并降低分辨率。

第四部分：染色质免疫沉淀 (IP)

为了得到理想的 ChIP 结果,每个 IP 反应需要 10-15 μg 回收后纯化 DNA 对应体积的交联染色质,约为来自 4×10^6 细胞或 25 mg 组织产生的染色质片段。一般在与抗体孵育前,需要把第二部分获得染色质样品中添加 1X ChIP Sonication Buffer(ChIP 超声缓冲液)到 500 μL (默认一般 IP 体积)。

实验开始之前准备:

- 取出并预热 100X 蛋白酶抑制剂混合物 PIC, 确保 PIC 完全溶解。
 - 预热 10X 超声缓冲液, 确保其中 SDS 完全溶解。
 - 上述已制备的染色质片段样品, 置于冰上。
 - 配制 1X 低盐漂洗液: 每个 IP 反应预备 2 mL, 置于冰上。
 - 配制 1X 高盐漂洗液: 每个 IP 反应预备 2 mL, 置于冰上。
 - 轻微重悬混匀 ChIP 级 蛋白 A/G 磁珠, 取 30 μL 磁珠(为方便吸取, 可在吸取微珠前将 100 μL 枪头前端剪去小部分使用)加入 200 μL 1x 超声缓冲液,混匀后将离心管放在磁性分离架上, 将蛋白 A/G 磁珠吸附至管壁。等 1-2 min 溶液澄清后, 小心地将上清吸走。(如磁珠非特异性吸附较强可继续以下操作)加入 200 μL 3% BSA 溶液 (TE 缓冲液配制) 4°C 的转子上孵育 1hr。孵育完成后加入 200 μL 1x 超声缓冲液清洗磁珠 2 次。
1. 根据预定实验设计(一般实验分组可以参考表 2), 确定免疫沉淀反应总数, 为免疫沉淀反应准备足够的 1X 染色质免疫沉淀缓冲液, 并使用前新鲜加入合适体积的 100X PIC, 混匀后置于冰上。在确定免疫沉淀总反应数时, 每一个样品组反应数计算应至少包括目的蛋白抗体管(可能为多种不同目的蛋白抗体, 根据抗体种类数确定)和阴性对照管(一般为抗体种属来源同型 IgG, 比如目的蛋白免疫沉淀使用兔抗, 阴性对照管就使用正常兔 IgG)的总数。同时, 对于初次进行 ChIP 实验的用户, 我们推荐每组加一个阳性对照沉淀反应管, 通常使用 Histone H3 抗体进行 ChIP 反应作为阳性对照。

表 2: 实验分组示例

Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Input #1	Input #2	Input #3	Input #4
Tube for IgG (negative ctrl)	Tube for IgG (negative ctrl)	Tube for IgG (negative ctrl)	Tube for IgG (negative ctrl)
Tube for Target protein Ab 1	Tube for Target protein Ab 1	Tube for Target protein Ab 1	Tube for Target protein Ab 1
Tube for Target protein Ab 2	Tube for Target protein Ab 2	Tube for Target protein Ab 2	Tube for Target protein Ab 2
H3 Ab (positive ctrl)	H3 Ab (positive ctrl)	H3 Ab (positive ctrl)	H3 Ab (positive ctrl)

2. 在每个 IP 反应管加入等量交联后的染色质样品(10-15 μg 回收后纯化 DNA 对应体积的交联染色质, 来自第二部分第 8 步), 并用 1X 超声缓冲液补至总体积为 500 μL 。

3. 将稀释后的 ChIP 染色质，每个样品管吸取 25 μ L 样品并转移到一个新的离心管中，作为 5% 样品输入(Input)对照，不进行免疫沉淀反应，暂时可以保存在-20°C 冰箱 (Input 样品后续会在第五部分的第 1 步取出，与其他沉淀反应后染色质样品同步进行后续操作)。
4. 在各个目的蛋白样品管中加入对应抗体，在各个对应阴性对照管中加入正常同型 IgG。每种抗体用量需根据相关抗体说明书及浓度进行添加，每个沉淀反应所需对应抗体量为 2-5 μ g，在 4°C 的转子上孵育至少 3hr(不建议过夜)。

注意：ChIP 实验中，抗体用量很关键，过多或过少的抗体都会对靶标富集度造成负面影响。

5. 将第 4 步反应液 10,000 g 离心 10 s，吸取全部反应液加入到对应标记的磁珠管中，重新封严管子，在 4°C 的转子上孵育 2 hr。
6. 将离心管放在磁性分离架上，将蛋白 A/G 磁珠吸附至管壁。等 1-2 min 溶液澄清后，小心地将上清吸走。此上清可以暂时保留，以备查找问题时使用。
7. 加入 1 mL 低盐漂洗液，并将样品管从磁性分离架取下，在 4°C 转子上转动并孵育 5 min。重新把样品置于磁性分离架，等 1-2 min 溶液澄清后，小心地将上清吸走。
8. 加入 1 mL 高盐漂洗液，并将样品管从磁性分离架取下，在 4°C 转子上转动并孵育 5 min。重新把样品置于磁性分离架，等 1-2 min 溶液澄清后，小心地将上清吸走。
9. 当通过预实验发现抗体非特异性吸附较强时，可以在此步加入 1 mL LiCl 漂洗液，并将样品管从磁性分离架取下，在 4°C 转子上转动并孵育 5 min 后，重新把样品置于磁性分离架，等 1-2 min 溶液澄清后，小心地将上清吸走。
10. 加入 1 mL TE 缓冲液，并将样品管从磁性分离架取下，不用孵育，涡旋振荡后重新把样品置于磁性分离架，等 1-2 min 溶液澄清后，小心地将上清吸走。重复本步骤一次，即 TE 洗 2 遍。立即进入第五部分染色质洗脱流程。

第五部分：染色质洗脱并解交联

实验开始之前准备：

- 从冰箱中取出并在 37°C 水浴中预热 ChIP 洗脱缓冲液，并确认 SDS 已完全溶解。
 - 将水浴锅或温控混匀器设定到 65°C。
1. 取 125 μ L ChIP 洗脱缓冲液分别加入到每组对应的 5% 样品输入对照(5% Input)管中，室温放置直到第 7 步。
 2. 在其他每管 ChIP 免疫沉淀样品中分别加入 150 μ L ChIP 洗脱缓冲液。
 3. 将加入洗脱缓冲液的 ChIP 免疫沉淀样品在 65°C 孵育 30 min，中间可每隔 5 min 用涡旋混合器轻轻震荡(1,200 rpm)，将染色质从抗体-蛋白 A/G 磁珠上洗脱下来。此步用金属温控振荡器(即带有振荡功能的金属浴)效果最好；或在 65°C 的水浴锅中振荡孵育。另外，洗脱也可以在室温下的转子上进行，但洗脱效果可能不如温控振荡器完全。
 4. 10,000 g 离心 10 s 收集离心管盖子上的残留样品。
 5. 将离心管放在磁性分离架上吸附蛋白 A/G 磁珠，等 1-2 min 使溶液澄清。
 6. 小心地将每个样品管中洗脱下来的染色质上清转移到一个新的离心管中，并分别标记。
 7. 在所有管中，包括第一步的 5%样品输入对照(5% Input)管，都加入 6 μ L 5 M NaCl 和 2 μ L RNase A，37°C 孵育 30 min，再加入 2 μ L 蛋白酶 K，并在 65°C 孵育 4 hr 或过夜。
 8. 取出所有样品管，恢复至常温后，可直接进入第 VII 部分，或者可保存样品在-20°C 冰箱，暂停操作。为了避免在低温形成沉淀，在第六部分进行 DNA 纯化前，需确保样品回复室温。

第六部分：离心柱纯化DNA

1. 每 150 μL 体系中依次加入 150 μL 异丙醇，750 μL Buffer DB，充分混匀。如有结晶，可以加热混匀。
2. 取一个新的硅胶膜吸附柱子装在收集管中，吸取 100 μL 的平衡缓冲液至柱子中。13000 rpm 离心 1 分钟，倒掉收集管中废液，将吸附柱子重新放回收集管。

注意：请使用当天处理过的柱子。

3. Buffer BL 预处理吸附柱后，将第一步所得溶液分 2 次加入吸附柱中，室温放置 1 min，12,000 rpm 离心 30-60 s，倒掉收集管中的废液。
4. 加入 600 μL Buffer WB （请先检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm 离心 30 s，弃掉废液。
5. 加入 600 μL 漂洗液 WB，12,000 rpm 离心 30 s，弃掉废液。
6. 将吸附柱 SC1 放回空收集管中，12,000 rpm 离心 2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
7. 取出吸附柱 SC1，放入一个干净的离心管中，在吸附膜的中间部位加 50 μL Buffer EB（洗脱液事先在 65-70°C 水浴中加热效果更好），室温放置 2 min，12,000 rpm 离心 1 min。如果需要较多量 DNA，可将得到的溶液重新加入吸附柱中，离心 1 min。
8. 将每个管子中的 DNA 离心柱取出并丢弃，离心管中的洗脱液即为纯化的 DNA。
9. 纯化后的 DNA 用 Qubit 仪器进行浓度检测。

注意：样品可保存在-20°C 冰箱。

第七部分：qPCR定量分析ChIP实验结果

实验相关建议：

- 实验中使用带滤芯的枪头以尽可能减少污染的可能性。
- 设计阳性对照和阴性对照引物，用于质量控制，检测是否存在假阳性和假阴性结果。
- 建议使用热启动 Taq 聚合酶以减少产生非特异 PCR 产物的风险。
- PCR 引物的选择很关键。引物应尽可能按照下列标准来设计：

引物长度	24 个核苷酸
最佳 Tm 值	60°C 左右
最佳 GC 含量	50%
扩增片段长度	150-200 bp （用于常规 PCR） 80-160 bp （用于实时定量 PCR）
特异性	经过 NCBI primer blast 分析，特异性较高

常规 PCR 操作：

1. 按样品数将合适数目的 PCR 管或 PCR 板做好标记。注意包括 5% 样品输入对照(Input)组，阳性对照(组蛋白 H3 样品)组，阴性对照(正常兔 IgG 样品)组，以及一个监控 DNA 污染的无 DNA 模板的空白组对照。
2. 在每管中加入 2 μ L 各自对应的 DNA 样品作为模板以及 6 μ L ddH₂O，即 Input 组需要加入稀释后的 Input DNA 样品作为模板，而其他反应管需要按照实验设计的分组(常见实验分组如下图)，加入对应的 ChIP 沉淀后获得的 DNA 作为模板。

		Input		IgG (negative ctrl)		Target protein Ab		H3 Ab (positive ctrl)	
		1	2	3	4	5	6	7	8
Primer 1	A	对照组 Input DNA	实验组 Input DNA	对照组 IgG ChIP DNA	实验组 IgG ChIP DNA	对照组 Target ChIP DNA	实验组 Target ChIP DNA	对照组 H3 ChIP DNA	实验组 H3 ChIP DNA
	B	对照组 Input DNA	实验组 Input DNA	对照组 IgG ChIP DNA	实验组 IgG ChIP DNA	对照组 Target ChIP DNA	实验组 Target ChIP DNA	对照组 H3 ChIP DNA	实验组 H3 ChIP DNA
	C	对照组 Input DNA	实验组 Input DNA	对照组 IgG ChIP DNA	实验组 IgG ChIP DNA	对照组 Target ChIP DNA	实验组 Target ChIP DNA	对照组 H3 ChIP DNA	实验组 H3 ChIP DNA
Primer 2	D	对照组 Input DNA	实验组 Input DNA	对照组 IgG ChIP DNA	实验组 IgG ChIP DNA	对照组 Target ChIP DNA	实验组 Target ChIP DNA	对照组 H3 ChIP DNA	实验组 H3 ChIP DNA
	E	对照组 Input DNA	实验组 Input DNA	对照组 IgG ChIP DNA	实验组 IgG ChIP DNA	对照组 Target ChIP DNA	实验组 Target ChIP DNA	对照组 H3 ChIP DNA	实验组 H3 ChIP DNA
	F	对照组 Input DNA	实验组 Input DNA	对照组 IgG ChIP DNA	实验组 IgG ChIP DNA	对照组 Target ChIP DNA	实验组 Target ChIP DNA	对照组 H3 ChIP DNA	实验组 H3 ChIP DNA
Primer ...	G								
	H								

3. 按每管 10 μ L 2X PCR master mix+2 μ L 引物(对)配制总管数对应的 PCR 总反应液，记住计算时多算两份以补偿分管时的体积损失。配好后，向每个 PCR 管中加入 12 μ L 反应液混合物。

加样体系(20 μL):	
2X PCR Mix	10 μL
F+R Primer(5 μM)	2 μL
DNA(<50 ng)	2 μL
ROX	0.4 μL
ddH ₂ O	5.6 μL

PCR 程序:		
预变性	95°C 3 min	1 cyc
循环	95°C 5 s	40 cycs
	60°C 30 s	
融解曲线	默认	

以上为用 RK21204 qPCR mix 的体系和程序，如使用其他产品请参考对应产品说明书

➤ PCR反应体系

20 ul reaction

2 ul ChIP-DNA / input DNA

2 ul primer (5 uM)

10 ul qPCR Master Mix

6 ul Water

10 ul reaction

2 ul ChIP-DNA / input DNA

1 ul primer (5 uM)

5 ul qPCR Master Mix

2 ul Water

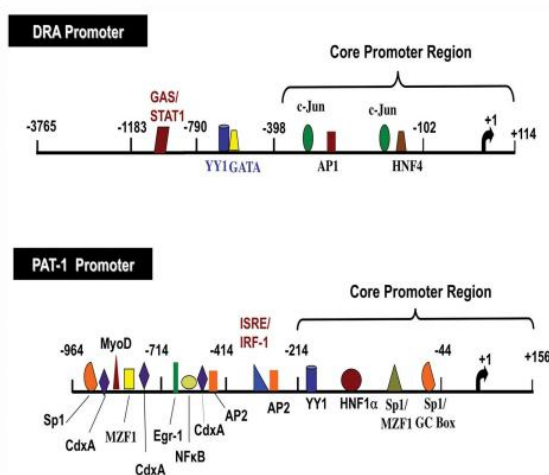
➤ DNA模板

- Input DNA
- 阴性对照 (IgG) 抗体IP后的DNA
- 目的蛋白抗体IP后的DNA
- 以及试剂盒内提供的阳性对照 (组蛋白H3) 抗体IP后的DNA

➤ PCR引物对照

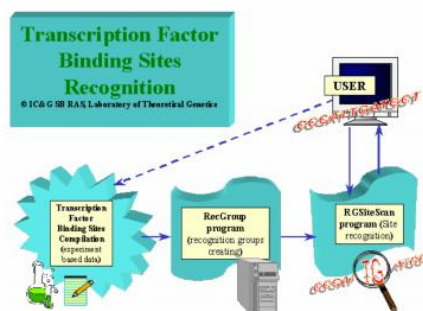
- 阳性对照：已知结合位点
- 阴性对照：内含子区域、看家基因等

注意：引物具体设计区域一般为基因转录起始位点上游 2 kb 区域内(如下图所示)，可参考已发表的文獻。



<http://www.biochemj.org/content/ppbiochemj/435/2/313/F3.large.jpg>

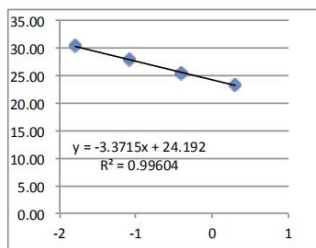
TF	Binding Site Graphs	Gibbs sampling (best MotifScore)	Gibbs sampling (manual with choice)
HSF1			
LEU3			
SIP4			
RDS1			N/A



新合成的引物，需要先用 Input DNA 作为模板，按照标准 qPCR 两步法程序(含熔解曲线反应时间)进行 qPCR 反应测试，通过观察熔解曲线确认引物特异性。同时，利用梯度稀释比例(如 1:5、1:25、1:125)的 Input DNA 作为模板，分别通过 qPCR 反应获得对应的 Ct 值，以绘制标准曲线确定引物扩增效率(希望引物扩增效率在 90%-110%)。扩增效率如果较高，此标准曲线应该呈线性。

➤ 标准曲线Input :

	% Input	X axis Log10 (% Input)	Y axis CT #1	Y axis CT #2
Input	2	0.301	23.26	23.37
1:5 Input	0.4	-0.398	25.44	25.20
1:25 Input	0.08	-1.097	27.78	28.00
1:125 Input	0.016	-1.796	30.43	30.21



斜率： -3.1 ~ -3.6

PCR扩增效率 = $(10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100$
90-110%

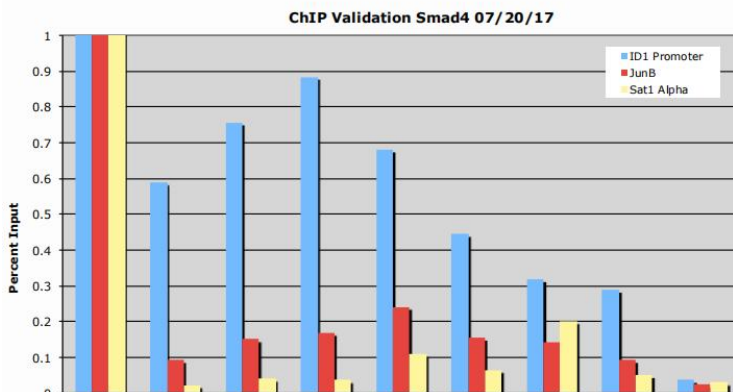
% Input = $10^{((\text{CT sample} - \text{Y截距})/\text{斜率})}$

- 按照标准 qPCR 两步法程序(含熔解曲线反应时间)。
- 程序运行结束后，用 qPCR 仪自带的程序分析定量结果，或利用下列公式自行计算，根据实验结果进行 ChIP 富集效率的计算。
- Percentage of Input = $5\% \times 2^{(\text{CT Input Sample} - \text{CT IP Sample})}$

➤ ChIP富集效率：

% Input = $2\% \times 2^{(\text{CT Input} - \text{CT sample})}$

例如：CT Input = 23, CT Sample = 26, % Input = $2\% \times 2^{(23-26)} = 0.25\%$



➤ %Input绝对值：

- 阳性对照H3 > 1%
- 阴性对照IgG < 0.1%
- 组蛋白类范围：1-50%
- 转录因子类范围：0.2-1%

➤ 相对值-信噪比：

- ChIP信号/IgG信号：8-10倍
- ChIP信号/阴性位点信号：3-5倍

第二章：DNA建库流程

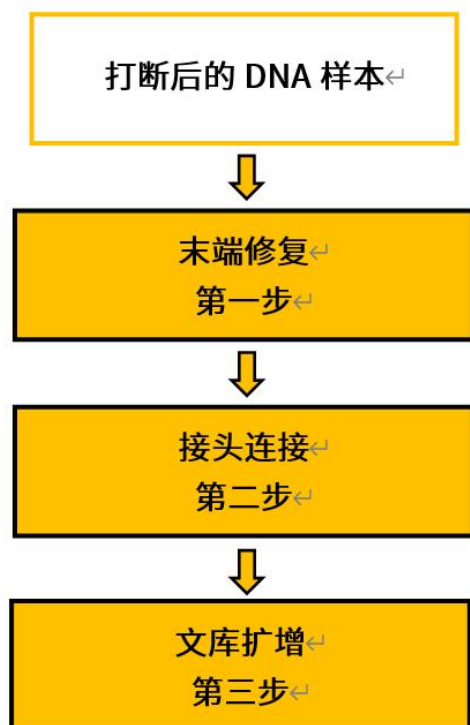
对于 Illumina[®]测序平台，使用 ABclonal 公司自产建库试剂盒构建 DNA 文库。

摘要：

- Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2 试剂盒起始 DNA 最大体积是 47 μ L, Scale ssDNA-seq Lib Prep Kit for Illumina V2 (10 pg-200 ng) 试剂盒起始 DNA 最大体积是 15 μ L。
- 对于组蛋白或组蛋白修饰蛋白，或 Input 样品，起始量为 50 ng 的 ChIP 富集 DNA 样品，使用 Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2 试剂盒建库，添加接头的 DNA 进行 6 个循环 PCR 扩增。
- 对于 ChIP-seq 实验中的转录因子或辅助因子，如 ChIP DNA 总量大于 10 ng，取 10 ng ChIP 后的 DNA，使用 Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2 试剂盒建库，添加 1:5 稀释接头的 DNA 进行 10 个循环 PCR 扩增。如 ChIP DNA 总量小于 10 ng，取 1 ng ChIP 后的 DNA，使用 Scale ssDNA-seq Lib Prep Kit for Illumina V2 (10 pg-200 ng) 试剂盒建库，添加接头的 DNA 进行 13 个循环 PCR 扩增。
- 所有 ChIP 富集 DNA 样品进行建立 DNA 文库时，直接纯化接头连接的 DNA 样品，且不需进行大小筛选。
- 建好 DNA 文库后，使用 Agilent High Sensitivity DNA Kit，检测 DNA 文库样本中是否有接头二聚体(~140 bp) 残留。若接头二聚体存在，对 PCR 扩增产物进行二次纯化，去除接头二聚体残留。
- 在完成最终的质量检测后，取 15 μ L 3 ng/ μ L 的文库样品外送进行高通量测序，测序模式为 PE150，数据量一般 Input 和 IgG 样品为 6 G，ChIP 样品为 12 G。此为 Human 样品的一般要求，其他物种的样本酌情增减。

第一部分：Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2试剂盒建库流程

工作流程：



操作流程：

第一步 末端修复

1.1 在无菌 PCR 管中准备如下反应体系：

试剂	体积
片段化的 DNA	X μ L
End Prep Buffer II	7 μ L
End Prep Enzymes	3 μ L
Nuclease-free Water	Up to 60 μ L
总体积	60 μ L

1.2 使用移液器上下吹打，充分混匀。

1.3 将 PCR 管放到 PCR 仪上，反应程序见下表，PCR 仪热盖设置为 75°C；之后 4°C 保存。

温度	时间
20°C	30 min
65°C	30 min
4°C	∞

第二步 接头连接

50 ng 起始量 DNA 建库不需要稀释接头，10 ng 起始量 DNA 建库使用 Low-EDTA TE Buffer 5 倍稀释的接头。

2.1 准备如下反应体系：

试剂	体积
End Prep Reaction Mix (步骤 1.3)	60 μ L
Ligation Buffer	30 μ L
ddH ₂ O	5 μ L
Ligation Enzymes II	10 μ L
Working Adaptor (按表 4 稀释后的接头)	5 μ L
总体积	110 μ L

2.2 将 PCR 管放置于 PCR 仪上，反应程序为 22°C、15 min，PCR 仪不设热盖，之后 12°C 保存。

2.3 DNA 样本纯化

2.3.1 每个样本中加入 88 μ L (0.8X) AFTMag NGS DNA Clean Beads，混匀。

2.3.2 室温孵育 5 min。

2.3.3 将 PCR 管于磁力架上静置 2 min，待溶液澄清后，移除上清液(注意不要碰到磁珠)。

2.3.4 加入 200 μL 80%的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。

2.3.5 重复步骤 2.3.4。

2.3.6 保持 PCR 管在磁力架上，使用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留。

2.3.7 在 21 μL ddH₂O 中重悬磁珠，室温静置 1 min，使磁珠上的 DNA 充分释放。

2.3.8 将 PCR 管于磁力架上静置 2 min，转移 20 μL 上清液至一个新 PCR 管中，进行文库扩增。

第三步 文库扩增

3.1 配制如下 PCR 反应体系：

表格 8.1 文库扩增体系（长接头-单端/双端/UMI）

(适用接头类型：Cat.NO RK20298, RK20292, RK20293, RK21600, RK21601, RK21602, RK21603, RK21604, RK21605, RK21606, RK21607, RK21608)

组分	体积
接头连接的 DNA	20 μL
Gloria Nova HS 2X PCR Mix for NGS	25 μL
10X PCR Primers	5 μL
总体积	50 μL

表格 8.2 文库扩增体系（短接头-单端 Index）

(适用接头及 Index 类型：Cat.NO RK20294, RK20295, RK20297)

组分	体积
接头连接的 DNA	20 μL
Gloria Nova HS 2X PCR Mix for NGS	25 μL
PCR Index	2.5 μL
Universal PCR Primer	2.5 μL
总体积	50 μL

表格 8.3 文库扩增体系（短接头-双端/CDI Index）

(适用接头及 Index 类型：Cat.NO RK20287, RK20296)

组分	体积
接头连接的 DNA	20 μ L
Gloria Nova HS 2X PCR Mix for NGS	25 μ L
I5 Primer	2.5 μ L
I7 Primer	2.5 μ L
总体积	50 μ L

表格 8.4 文库扩增体系（短接头-UDI Index）

(适用接头及 Index 类型：Cat.NO RK21622, RK21623, RK21624, RK21625)

组分	体积
接头连接的 DNA	20 μ L
Gloria Nova HS 2X PCR Mix for NGS	25 μ L
UDI Primer	5 μ L
总体积	50 μ L

3.2 移液器吹打混匀并瞬时离心。

3.3 设置如下 PCR 扩增程序：

温度	时间	Cycles
98°C	1 min	1
98°C	10 s	50 ng DNA, 进行 6 个循环 PCR 扩增; 10 ng DNA, 进行 10 个循环 PCR 扩增
60°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	1 min	1
4°C	∞	1

3.4 向扩增产物中加入 50 μ L (1X) AFTMag NGS DNA Clean Beads，混匀。

3.5 室温下孵育 5 min。

3.6 将样本于磁力架上静置 2 min，待溶液澄清后，移除上清液（注意不要碰到磁珠）。

3.7 加入 200 μ L 80%的乙醇漂洗磁珠，孵育 30 s 后移除上清。

3.8 重复步骤 3.7。

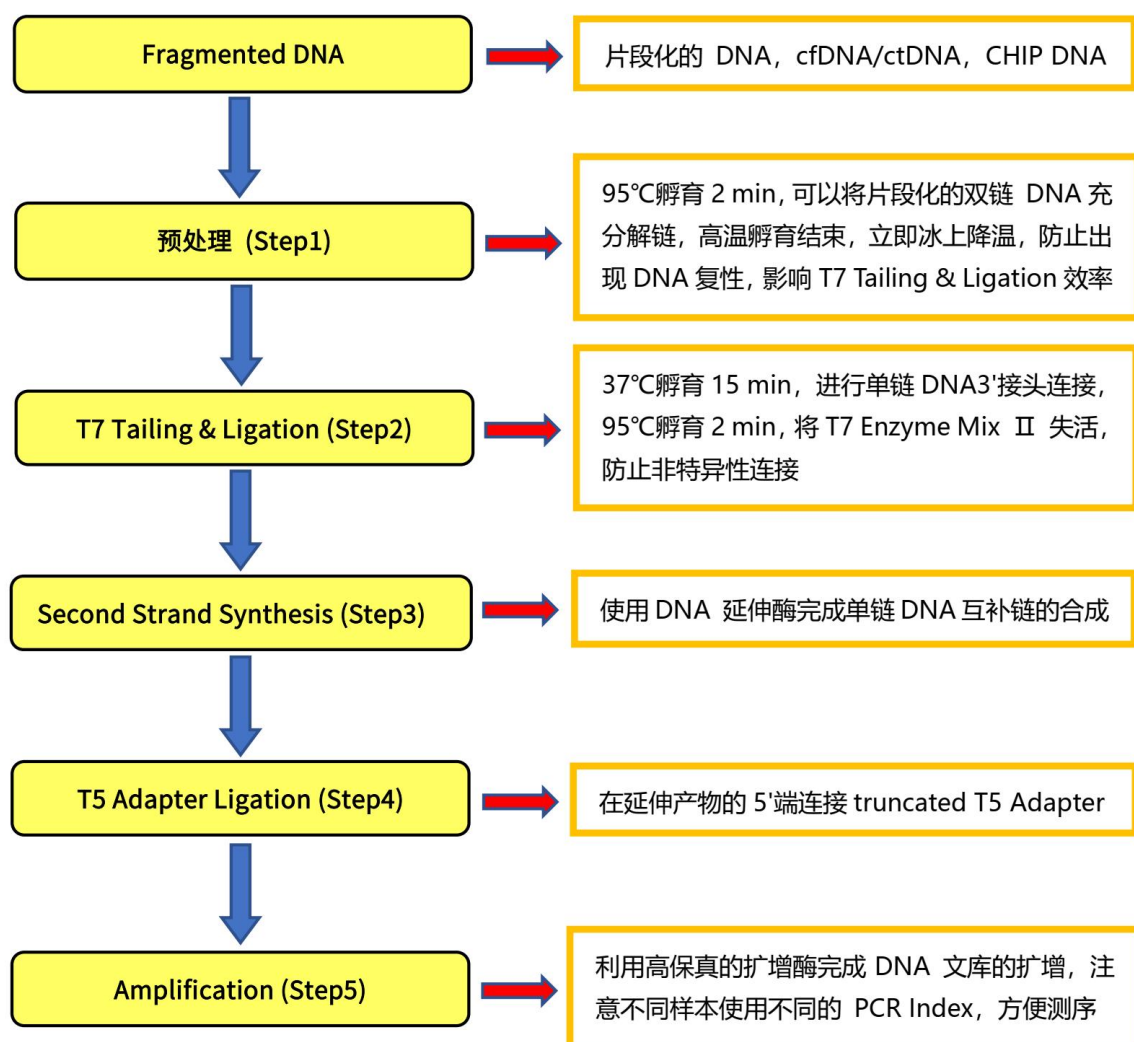
- 3.9 保持 PCR 管在磁力架上，用 10 μL 移液器移除管底残留的乙醇，打开管盖干燥至无乙醇残留。
- 3.10 在 31 μL ddH₂O 中重悬磁珠，室温静置 1 min，使磁珠上的 DNA 充分释放。
- 3.11 将样本于磁力架上静置 2 min，转移 30 μL 上清液至一个新 PCR 管中用于文库扩增。
- 3.12 文库保存在-20℃冰箱，以便于进行文库质量检测和上机测序。

第二部分：单链建库试剂盒操作流程

注意事项：

使用前尽量保证 T7 Buffer、T7 Adapter、2X Synthesis Mix、Synthesis Reagent、T5 Buffer II、T5 Adapter II 和 2X PCR Master Mix 试剂溶液完全融解充分，无沉淀，瞬时离心至管底部。试剂盒溶液组分可以在室温下进行充分融解。使用时，试剂盒组分放置在冰上。产品组分使用完后，请尽快放置于-25~-15℃条件下进行保存。T7 Buffer 请避光保存。

工作流程：



操作流程：

1. DNA 模板预处理

热循环仪(PCR 仪)提前置于 95°C，热盖温度设定为 105°C，配制 T7 Tailing & Ligation 预混液，冰上放置待用。

*, 注：热循环仪(PCR 仪)提前置于 95°C，待 2 min 结束，要立即置于冰上，保证 DNA 最大程度的以 ssDNA 的形式存在；在进入 DNA 预处理之前，可以将 T7 Tailing&Ligation 预混液提前配制好，充分混匀后，冰上放置。

1.1 取片段化 DNA (10 pg-200 ng) 放在 0.2 mL 的 PCR 管中，加入 Low-EDTA TE 稀释到总体积为 15 μ L。

1.2 待 PCR 仪器稳定到 95°C后,将 PCR 管放入 PCR 仪中,进行 95°C孵育 2 min 后,立即将 PCR 管置于冰上进行冷却，静置 2 min。

2. T7 Tailing & Ligation

热循环仪(PCR 仪)提前置于 37°C，热盖温度 105°C。

2.1 按照下面表配制 T7 Tailing & Ligation 预混液，需要在预处理前配制好，冰上放置时间最好不要超过 20 min。

试剂	体积
T7 Buffer	4 μ L
T7 Adapter	2.5 μ L
T7 Enzyme Mix II	3 μ L
Low-EDTA TE	15.5 μ L
Total	25 μ L

2.2 取 25 μ L T7 Tailing & Ligation 预混液加入到冰上放置的预处理 DNA 样本 PCR 管中(步骤 1.2)，使用移液器进行吹打混匀，然后瞬时离心使得反应液至管底。

2.3 将 PCR 管置于 PCR 仪(热盖 105°C)中，进行 T7 Tailing & Ligation。

温度	时间
37°C	15 min
95°C	2 min
4°C	Hold

3. Second Strand Synthesis Reaction

热循环仪(PCR 仪)提前置于 98°C，热盖 105°C。

3.1 按照下表体系配置 Second Strand Synthesis Reaction 预混液；

试剂	体积
2X Synthesis Mix	43 μ L
Synthesis Reagent	3 μ L
总体积	46 μ L

3.2 取 46 μ L Second Strand Synthesis Reaction 预混液加入到 T7 Tailing &Ligated mix (步骤 2.3) 中，使用移液器进行吹打混匀，然后瞬时离心使得反应液至管底；

3.3 将 PCR 管置于 PCR 仪 (热盖 105°C) 中，进行二链合成反应：

温度	时间
98°C	1 min
60°C	2 min
68°C	5 min
4°C	Hold

3.4 提前将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 从 2-8°C取出，静置平衡至室温，使用前涡旋或者震荡混匀。

3.5 待 Second Strand Synthesis Reaction 结束后，在产物中加入 105 μ L AFTMag NGS DNA Clean Beads (1.2X)，吹打混匀。

3.6 室温静置 5 min，然后转移至磁力架上约 5 min，直至溶液变澄清，小心弃除上清。

3.7 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μ L 80%乙醇静置 30 s，弃除全部上清。

3.8 重复 3.7，将磁珠用 80%乙醇再洗 1 次，用 10 μ L 枪头将残留液体彻底吸干。

3.9 干燥磁珠 2-3 min，待酒精挥发完全后，将 PCR 管移出磁力架，加入 51 μ L Low-EDTA TE，吹打混匀，然后室温静置 2 min。

3.10 将 PCR 管放置到磁力架上室温静置，直到溶液变澄清，小心吸取 50 μ L 上清液至另一新的 PCR 管中。

3.11 使用 1.2X 磁珠 (60 μ L 磁珠) 进行再次纯化 (重复步骤 3.5-3.9),最后使用 21 μ L Low-EDTA TE 洗脱进行下面步骤。此步骤可以显著减少在有效模板过低的情况下导致的文库中存在接头二聚体情况。

4. T5 Adapter Ligation

4.1 按照下面表格配制 T5 Adapter Ligation 反应体系，依次加入如下组分，使用移液器进行吹打混匀，然后瞬时离心使得反应液至管底。

试剂	体积
Double Stranded DNA (步骤 3.10)	20 μ L

Low-EDTA TE	4 μ L
T5 Buffer II *	8 μ L
T5 Adapter II *	5 μ L
Ligase Mix*	3 μ L
Total	40 μ L

*, 注：可以提前配制 T5 Buffer II 和 T5 Adapter II 的预混液，切不可将 T5 Buffer II、T5 Adapter II 和 Ligase Mix 预混，以免出现接头自连反应。

4.2 将 PCR 管置于 PCR 仪（热盖加热功能关闭，或者热盖不要合上）中，进行连接反应。

温度	时间
25°C	15 min
4°C	Hold

4.3 提前将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 从 2-8°C取出，静置平衡至室温，使用前涡旋或者震荡混匀。

4.4 连接反应结束后，加入 40 μ L AFTMag NGS DNA Clean Beads (1.0X)到连接产物中，吹打混匀。

4.5 室温静置 5 min，然后转移至磁力架上 5 min，直至溶液变澄清，小心弃除上清。

4.6 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μ L 80%乙醇，静置 30 s，弃除全部上清。

4.7 重复 4.6，将磁珠用 80%乙醇再次清洗一次，用 10 μ L 枪头将残留液体彻底吸干。

4.8 干燥磁珠 2-3 min，将 PCR 管移出磁力架，加入 21 μ L Low-EDTA TE，吹打混匀，然后室温静置 2 min。

4.9 将 PCR 管放置到磁力架上，室温静置直到溶液变澄清，小心吸取 20 μ L 上清液至另一新的 PCR 管中备用。

5. PCR 文库扩增

5.1 按照下表配制 PCR 反应体系：

试剂	体积
纯化后的连接产物（步骤 4.9）	20 μ L
2X PCR Master Mix	25 μ L
Universal PCR Primer	2.5 μ L
PCR Index Primer*	2.5 μ L
Total	50 μ L

*, 注：不同的样本应使用不同的 PCR Index Primer 进行样本标记，在操作 PCR Index Primer 时，一定要小心操作，避免样本与 Primer 之间的交叉污染。

5.2 使用移液器进行吹打混匀，然后瞬时离心使得反应液至管底，放置到 PCR 仪中。

5.3 按照如下程序进行 PCR 反应：

温度	时间	Cycles
98°C	45 s	1
98°C	15 s	13*
60°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	1 min	1
4°C	Hold	1

*, 注：PCR cycles, 1 ng CHIP DNA 使用 13 个循环，如起始量少于 1 ng，酌情增加循环数。

5.4 提前将 AFTMag NGS DNA Clean Beads 从 2-8°C取出，静置平衡至室温，使用前涡旋或者震荡混匀。

5.5 反应结束后，加入 50 μ L AFTMag NGS DNA Clean Beads (1.0X) 到 PCR 反应产物，吹打混匀。

5.6 室温静置 5 min，然后转移至磁力架上 5 min，直至溶液变澄清，小心弃除上清。

5.7 将离心管保持在磁力架上，加入 200 μ L 80%乙醇，静置 30 s，弃除全部上清。

5.8 重复 5.7，将磁珠用 80%乙醇再洗 1 次，用 10 μ L 枪头将残留液体彻底吸干。

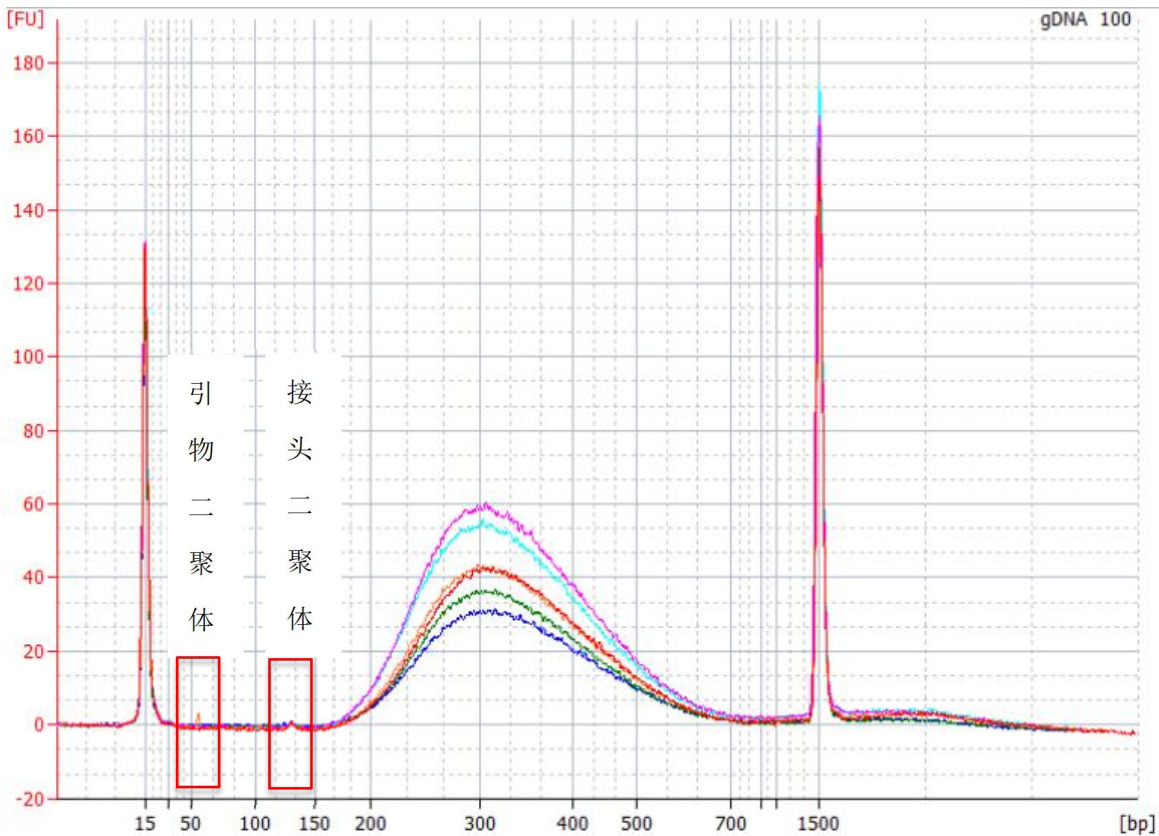
5.9 干燥磁珠 2-3 min，待酒精挥发完全后，加入 21 μ L Low-EDTA TE，吹打混匀。

5.10 室温静置 2 min，磁力架上 1 min，直到溶液变澄清，小心吸取 20 μ L 文库至另一新的离心管中，-20°C保存或用于后续测序分析。

第三部分 文库QC和上机送样

1、取 1 μ L 文库用 Qubit 和 dsDNA HS（高灵敏度）检测试剂盒进行浓度检测，合格的文库浓度应该在 3 ng/ μ L 以上。如浓度低于 3 ng/ μ L，是否可以上机测序，需咨询测序服务提供商。

2、取 1 μ L 文库用安捷伦 2100 和 Agilent High Sensitivity DNA Chip (Cat# 5067-4626)进行文库片段大小检测。合格的文库（如下图所示）应该呈现出单一的、圆滑的峰，且接近正态分布，长度范围在 200-700 bp，主峰在 300 bp 左右。注意二聚体污染问题，二聚体包括接头二聚体和引物二聚体，通常长度小于 100bp 的是引物二聚体，长度在 120bp 左右的是接头二聚体。文库中如果存在二聚体，在上机测序时，二聚体会与 flowcell 上面的锚定序列结合，并且可以通过桥式 PCR 扩增形成簇，从而降低测序的有效数据产量，同时由于二聚体序列短，在长簇时存在优势扩增，且是固定序列，其碱基复杂度低，且长度短，会降低测序的 Q30，影响 clean reads 的过滤率。二聚体污染越少越好，但没有一个明确的标准。



3、混库

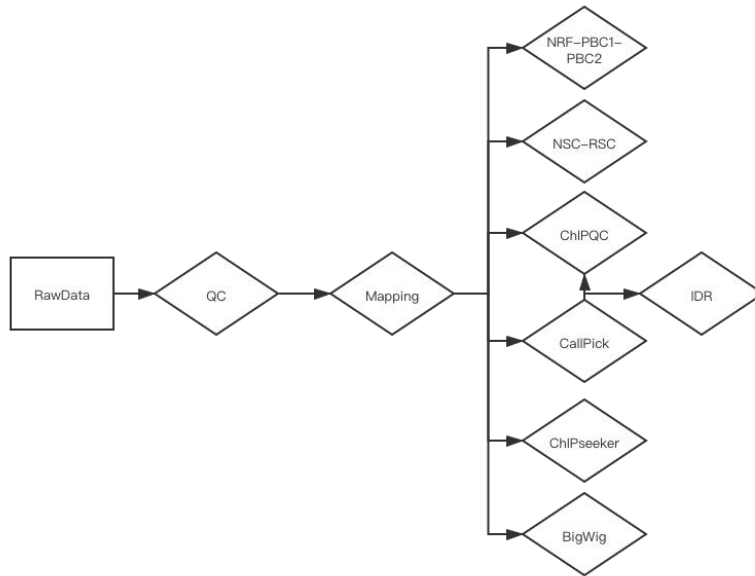
测序服务公司一般会根据文库数量收取质检费用，为了节省费用可以将测序所需数据量相同的文库和文库平均长度接近的文库进行混库。有 2 种方案供选择。方案 1 是按混好的文库共 100 ng DNA 计算。比如 2 个文库混库的话，各取 50 (100/2) ng 的 DNA 混合，补水至 20 ul。如 4 个文库混库的话，各取 25 (100/4) ng 的 DNA 混合，补水至 20 ul。方案 2 是将所有文库稀释成 5 ng/ul，再取适量体积的文库混合成一个文库。浓度低于 5 ng/ul 的文库不进行混库。混合后的文库取 1 ul 用 Qubit 进行浓度检测，浓度应该在 5 ng/ul 左右。混库操作会导致最终文库产出数据偏离预期值，如果对数据量非常在意，不要进行混库步骤。

4、送测

文库送样体积 ≥ 15 ul，混合文库浓度 ≥ 3 ng/ul；使用 1.5ml EP 管，封口膜封闭，管盖名称与文库名一致。填写电子档信息单，包括信息单名称，文库名，子文库名，i5 index 编号，i5 index 序号，i5 index 序列，i7 index 编号，i7 index 序号，i7 index 序列，文库类型，数据量。文库名与电子档信息单名称一致：组名称-年份-数字序号-字母序号，子文库名：组名称+数字序号+字母序号+libN。i5 端和 i7 端 index 信息需要填写完整，如果使用单端 index，电子档信息单中 i5 端所有信息请用“/”代替，切不可在电子档信息单表格中删除 i5 端；文库类型为 DNA 文库，数据量要求每个样本 12 G 或 6 G（input 和 IgG 样品）。将电子档信息单和测序实验说明邮件形式发送给生信部门，后续下机数据的下载和生信分析交由生信部门。

第三章：数据分析流程

工作流程：



操作流程：

1. 质量控制 QC

使用 fastp 软件对于下机的原始数据进行 QC，过滤掉影响后续分析的低质量数据。

```
fastp -i R1.fq.gz -l R2.fq.gz -o R1.clean.fq.gz -O R2.clean.fq.gz -h Sample.html -j Sample.json
```

fastp 软件执行结束后，统计 Sample.json 中记录的质控信息。

2. 数据比对 Mapping

使用 bwa 软件对于质控后的数据进行比对。

```
bwa mem -t 16 -M -R "@RG\tID:Sample\tPL:illumina\tLB:1\tSM:Sample" Ref R1 R2 | samtools
view -Sb -> Sample.raw.bam && samtools sort -n -o Sample.nsort.bam Sample.raw.bam &&
samtools fixmate -m Sample.nsort.bam Sample.fixmate.bam && samtools sort -o Sample.bam
Sample.fixmate.bam && samtools rmdup Sample.bam Sample.rmdup.bam && samtools index
Sample.bam && samtools index Sample.rmdup.bam
```


其中 Sample.bam 为排序过后的原始比对文件, Sample.rmdup.bam 为在 Sample.bam 的基础上去除 duplication 的比对文件。

3. CallPick

使用 macs2 软件进行 CallPick。

```
macs2 callpeak -f BAM -c input.rmdup.bam -t ChIP.rmdup.bam -g hs --outdir ./ -n ChIP
```

运行结束后进行对 Peak 的分级统计。

4. ChIPQC

使用 R 包 ChIPQC 进行统计。准备 ChIPQC 的标准输入表格。

```
data_list <- read.table("ChIPQC-list.xls",header=T)
```

```
chipObj <- ChIPQC(data_list,  
annotation="hg19",chromosomes=c("chr1","chr2","chr3","chr4","chr5","chr6","chr7","chr8","chr9",  
"chr10","chr11","chr12","chr13","chr14","chr15","chr16","chr17","chr18","chr19","chr20","chr21",  
chr22,"chrX","chrY"))
```

```
chip_QC <- QCmetrics(chipObj)
```

其中 chip_QC 变量中即为 ChIPQC 的统计结果。

参考网站:<https://www.jianshu.com/p/a11147808d14>

5. NRF_PBC1_PBC2

使用 Bedtools 软件进行 NRF、PBC1、PBC2 三个指标的统计。

```
bedtools bamtobed -i Sample.rmdup.bam | awk 'BEGIN{OFS="\t"}{print $1,$2,$3,$6}' | grep -v  
'chrM' | sort | uniq -c | awk 'BEGIN{mt=0;m0=0;m1=0;m2=0} ($1==1){m1=m1+1}  
($1==2){m2=m2+1} {m0=m0+1} {mt=mt+$1} END{m1_m2=-1.0; if(m2>0) m1_m2=m1/m2; printf  
"%f\t%f\t%f\n",m0/mt,m1/m0,m1_m2}' > NRF_PBC1_PBC2.xls
```

6. NSC-RSC

使用 phantompeakqualtools 软件进行 NSC-RSC 统计。

```
run_spp.R -c=Sample.rmdup.bam -rf -p=4 -filtchr="chrM" -savg=Sample.plot.pdf  
-out=Sample.score.txt
```

软件运行结束后从 Sample.score.txt 中提取 NSC-RSC 的结果。

7. ChIPseeker

使用 R 包 ChIPseeker 进行 Peak 的注释绘图。

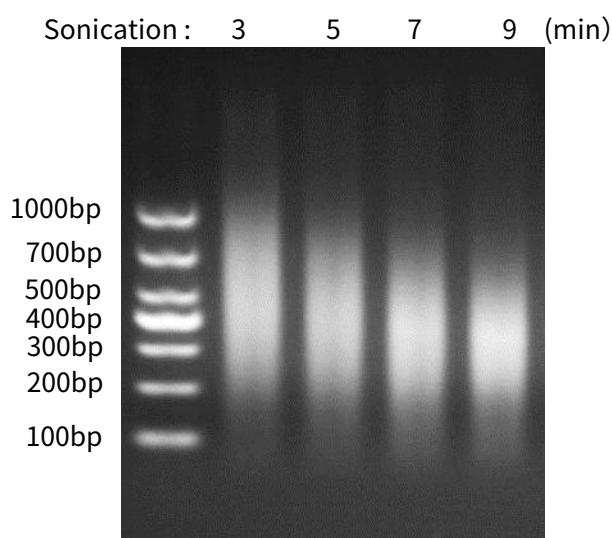
```
library("ChIPseeker")
library(TxDb.Hsapiens.UCSC.hg19.knownGene)
txdb <- TxDb.Hsapiens.UCSC.hg19.knownGene
files <- readPeakFile("Sample_peaks.xls")
peakAnno <- annotatePeak("Sample_peaks.xls",tssRegion=c(-3000, 3000),TxDb=txdb,
annoDb="org.Hs.eg.db")
covplot(files,
weightCol="fold_enrichment",chrs=c("chr1","chr2","chr3","chr4","chr5","chr6","chr7","chr8","chr
9","chr10","chr11","chr12","chr13","chr14","chr15","chr16","chr17","chr18","chr19","chr20","chr21",
"chr22","chrX","chrY"))
plotAnnoPie(peakAnno)
plotDistToTSS(peakAnno,title="Distribution of transcription factor-binding loci\nrelative to
TSS")
```

附录1：优化超声条件

注意：交联后的染色质样品需对超声条件进行优化，超声条件与细胞数量、超声体积、超声片段大小、超声仪设置的功率和累计超声时间等多种因素相关。因此，在正式开始批量 ChIP 实验前，我们强烈建议您首先对您所使用的细胞系(正常培养条件)的超声条件进行预先摸索。

我们建议超声体系为：重悬于 1 ml ChIP 超声缓冲液中的样品组(100 到 150 mg 组织，或 1×10^7 到 2×10^7 细胞)。如下为针对超声处理的优化步骤：

1. 按照如上第一和第二部分的操作准备所需超声样品，在第二部分第 4 步处停止，并开始如下操作。
2. 超声处理染色质样品：参考第二部分的第 5 步的建议，对超声仪器的超声功率和超声间隔时间等进行优化，
3. 通过设定超声时间梯度实验，每个时间节点取出部分样品（剩余样品可继续超声）来确定不同超声时间的染色质剪切效果。一般最初摸索超声时间，累计超声时间每增加 1 分钟设定 1 个检测节点为宜。
4. 将上述所有时间节点收集的超声处理后的染色质，21,000 g，4°C 离心 10 分钟，获取染色质上清样品。
5. 转移上清到新离心管，分别进行解交联（参考第五部分）和 DNA 纯化（参考第六部分）后，各取 20 μ l 样品，电泳检测 DNA 片段大小。
6. 根据超声优化建议，选择适当大小的染色质片段样品进行后续实验。如果染色质片段过大或过小，则需调整仪器的超声功率和超声间隔时间等进行优化，操作同上。



参考图片：对交联 10 min 的 10^7 个 293T 细胞样品，分别进行 3，5，7 或 9 min 超声处理。

附录2：常见问题及解决方案

问题	可能的原因	改进建议
所得消化后的染色质样品浓度过低	用于消化的细胞太少或者消化后细胞核没有完全裂解	如果染色质样品DNA浓度接近于200 µg/mL,则增加染色质的加入体积使每个反应中的DNA含量达到20 µg。
		在交联之前,对备用盘细胞计数确定实际所用的准确细胞数,并在超声处理前后用显微镜观察,确保细胞核已完全裂解。
染色质消化不够并且所得片段过长(大于900 bp)	细胞被过度交联。交联处理时间超过10 min可能会抑制染色质消化。	缩短交联处理的时间为10 min。
	消化时,细胞太多或微球菌核酶太少	在交联之前,对备用盘细胞计数确定实际所用的准确细胞数。可参考附录B在实验前优化消化条件。
染色质消化过度,片段太小(都是150 bp左右,一个核小体长度的片段)。将染色质完全消化成单核小体长度的片段会导致PCR定量时信号消失,特别是当PCR扩增片段大于150 bp时。	消化时,细胞太少或微球菌核酶太多	在交联之前,对备用盘细胞计数确定实际所用的准确细胞数。可参考附录B在实验前优化消化条件。
样品输入对照组没有PCR产物或很少产物。	PCR反应所加DNA模板量不足或是PCR条件不合适	增加PCR反应中DNA模板量或扩增循环数
	PCR所扩增的区域可能跨过了无核小体区域(在酶切时被切断)	以交联并消化后的染色质为模板优化所用引物的PCR条件。设计一对新的引物,使扩增片段的长度少于150 bp(参考G部分引物设计建议)。
	加入到免疫沉淀体系中的染色质太少或者染色质被过度	参考问题1、3的改进建议。

	消化	
阳性对照组蛋白H3抗体免疫沉淀组RPL30基因PCR扩增没有条带	加入到免疫沉淀体系中的染色质太少，或者抗体加的太少，或者免疫沉淀反应时间太短	用于每个IP的染色质至少需要20 μg，抗体不少于10 μL。抗体与染色质需要孵育过夜，加入蛋白G微球后再放两个小时。
	染色质从蛋白G微球上洗脱不完全	最佳的洗脱条件是将样品放在65°C并经常混匀使微球悬浮在溶液中
阴性对照免IgG免疫沉淀组和阳性对照组蛋白H3免疫沉淀组在PCR中得到相近量的产物	加入到免疫沉淀体系中的染色质或抗体太多	每个IP体系中加入的染色质不超过50 μg，抗体不多于10 μL。染色质或抗体太多会导致背景很高。
	PCR体系中模板DNA过多或PCR循环数过多	减少PCR体系中模板量或降低循环数。在PCR反应对数增长期分析结果非常重要，否则初始模板量的差异不能被精确检测。
实验抗体免疫沉淀组没有PCR产物	PCR体系中DNA模板量不足。	增加PCR反应中DNA模板量或扩增循环数
	免疫沉淀体系中加入的抗体量不足。	通常一个免疫沉淀反应需要的抗体量在1到10 μg之间。但是具体的用量因抗体而异。尝试增加免疫沉淀中的抗体量。
	所用抗体不适合免疫沉淀	