

中国
湖北省武汉市江夏区高新二路高科园三路9号武汉精准医疗产业基地
WEB: www.abclonal.com.cn
TEL: 400-999-6126
E-mail: cn.market@abclonal.com

USA
ABclonal Technology Co.,Ltd.
500W Cummings Park, Ste. 6500 Woburn,
MA 01801
WEB: www.abclonal.com
TEL: 888-754-5670
E-mail: info@abclonal.com



20211116/4.0

染色质免疫沉淀测序技术操作手册

CHROMATIN IMMUNOPRECIPITATION-SEQ TECHNICAL OPERATION MANUAL

COMPANY PROFILE

Antibody | Protein | ELISA Kits | Enzyme | NGS | Service

公司简介

武汉爱博泰克 (ABclonal) 生物科技有限公司是全球抗体与分子酶试剂核心供应商。ABclonal旨在为生命科学基础研究、转化医学、诊断与制药等多个领域提供专业可靠的产品与服务。公司主营业务包括科研抗体与分子酶试剂产品、NGS建库试剂及自动化解决方案、体外诊断原料、蛋白与核酸的分析检测设备、抗体发现服务等。公司总部位于中国武汉,目前在波士顿和上海设立有三个抗体与分子酶研发中心、武汉光谷生物城建设有抗体与分子酶大生产基地,并在美国、英国、日本、新加坡、中国台湾等国家和地区建立有营销中心。

2020年起,爱博泰克先后并购美国优睿赛思,投资莫纳生物、苏州极瞳、湖北新纵科,立志打造成中国生命科学工具解决方案全球领导品牌。过去的10年中,全球超过100,000客户选择ABclonal。

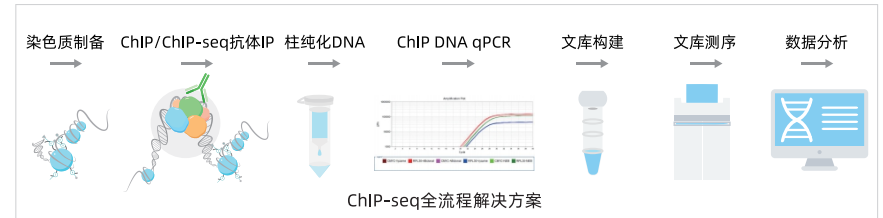
染色质免疫沉淀测序技术操作手册

目录

一、引言	1
二、ABclonal ChIP-seq全流程解决方案	2
三、ABclonal ChIP-seq相关产品性能和结果展示	3
3.1. 染色质超声片段化	3
3.2 ChIP DNA qPCR检测富集效率	3
3.3 ChIP DNA测序文库构建	4
3.4 ChIP-seq测序peak	5
四、实验流程和注意事项	6
4.1样本甲醛交联	6
4.2 细胞核抽提和裂解	7
4.3 染色质超声片段化	8
4.4 免疫沉淀	9
4.5 解交联及纯化DNA	10
4.6 ChIP DNA qPCR检测富集效率	11
4.7 ChIP DNA 构建测序文库	12
五、文库QC和送测序	14
六、数据分析	15
附录: 常见问题和解决方案	16

ABclonal ChIP-seq全流程解决方案

为最大程度帮助研究者顺利完成ChIP-seq实验、解决ChIP-seq实验环节中可能出现的各种问题，ABclonal开发了ChIP-seq全流程实验相关产品，其中包括ChIP试剂盒、ChIP/ChIP-seq级别的抗体、ChIP DNA纯化试剂盒、ChIP DNA qPCR检测试剂、ChIP DNA文库构建试剂盒，可为研究者提供一体化的ChIP-seq实验解决方案。



ChIP-seq 全流程解决 方案产品

- 染色质制备 — ABclonal Sonication ChIP Kit (RK20258)
- ChIP/
ChIP-seq抗体 — ChIP级别抗体91个，ChIP-seq级别抗体34个，数量持续增加中。
详细抗体清单见官网<https://abclonal.com.cn/>
- DNA纯化 — AFTSpin 多功能DNA回收纯化试剂盒 (RK30100)
- ChIP
DNA qPCR — 2X Universal SYBR Green Fast qPCR Mix (RK21203)
Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (RK21204)
- ChIP
DNA 建库 — Rapid Plus DNA Lib Prep Kit for Illumina V2 (RK20255)
Scale ssDNA-seq Lib Prep Kit for Illumina V2 (RK20228)
- 配套产品 — Unique Dual Index for Illumina (RK21622-RK21625)
Unique Dual Index (with UMI) for Illumina (RK21700-RK21703)
单链建库引物 PCR Index MinSet (8/24indices) (RK21640-21641)
单链建库引物 PCR Index Set_B/C (48indices) (RK21632-21633)
DNA 磁珠 AFMag NGS DNA Clean Beads (RK20257)
1.5mL 双排8孔/16孔磁力架 (AI20021-20022)
蛋白酶抑制剂Cocktail (RM02916)
ChIP 级蛋白 A/G 磁珠 (RM02915)

引言

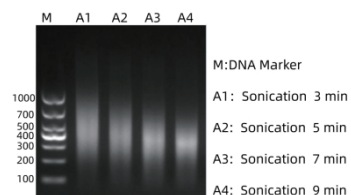
生物体内的蛋白质和DNA的互作是普遍存在的，基因表达、复制、重组和修复都涉及到DNA与蛋白质之间的相互作用。研究结果显示，高等动植物中DNA结合蛋白占到了总蛋白数量的10%。

早在十九世纪后期，科学家们就通过显微镜观察到了蛋白质与DNA之间存在相互作用。随后，研究者开始深入探索蛋白质与DNA互作的机制和生物学意义，并发明了一系列的蛋白与DNA互作研究方法，如凝胶阻滞实验、DNase I足迹实验、酵母单杂交等。但是，这些方法不能真实地反映体内的情况，假阳性太高。1980年染色质免疫共沉淀技术 (Chromatin immunoprecipitation assay, ChIP) 被提出，用于富集并研究特定蛋白质所结合的DNA片段。2000年基因微阵列技术 (Microarray) 被用来分析这些被特定蛋白所富集的DNA，这一技术称为ChIP-on-chip。随着二代测序技术的发展，ChIP-seq (Chromatin immunoprecipitation followed by sequencing)技术在2007年被提出，并被很多大型跨国研究计划，如ENCODE广泛采用，从而成为了研究DNA-蛋白质互作的金标准。

早期ChIP主要用于研究核小体结合的DNA及组蛋白修饰等，随着技术的不断发展，ChIP被广泛用于体内转录因子与靶基因启动子上特异序列结合的研究，成为在染色质水平研究基因表达调控的有效方法。特别是ChIP-seq技术，可在全基因组范围内筛选与特定蛋白质结合的DNA靶位点，有助于深入解析DNA与蛋白质相互作用的调控网络，使我们能够系统地了解基因表达调控如何影响发育、分化、肿瘤和其他疾病。

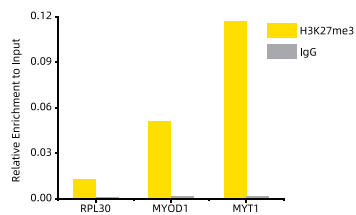
ABclonal ChIP-seq相关产品性能和结果展示

3.1 染色质超声片段化

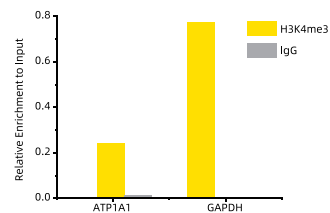


使用接触式超声仪(新芝, Scientz-IID)对 1×10^7 个293T细胞进行不同时间的超声破碎, 超声条件为: 功率50W, 超声开1s, 关1s。从电泳结果来看, 超声时间3min后DNA片段大小可以满足qPCR检测的需求; 超声时间9min后DNA片段大小可以满足NGS建库需求。

3.2 ChIP DNA qPCR检测富集效率



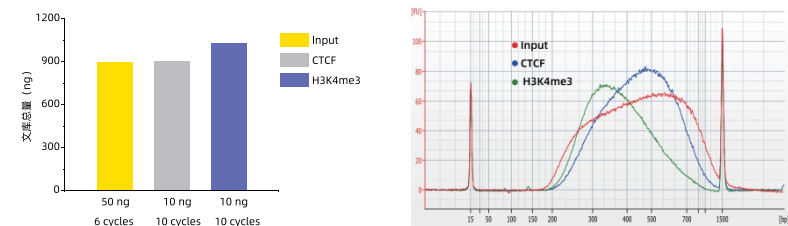
在293T细胞中用Tri-Methyl-Histone H3-K27 Rabbit pAb (A2363)和Rabbit Control IgG (AC005)抗体进行ChIP实验。使用ABclonal Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (RK21204)试剂对靶基因 *RPL30*、*MYO1* 和 *MYT1* 引物进行qPCR检测, 计算每个基因的富集效率 (ChIP样本相对于Input样本), 结果显示, Tri-Methyl-Histone H3-K27 Rabbit pAb对各基因的富集效率都远高于阴性对照Rabbit Control IgG, 说明H3K27me3修饰在这些基因上存在富集。



在293T细胞中用Tri-Methyl-Histone H3-K4 Rabbit pAb (A2357)和Rabbit Control IgG (AC005)抗体进行ChIP实验。使用ABclonal Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (RK21204)试剂对靶基因 *ATP1A1* 和 *GAPDH* 引物进行qPCR检测, 计算每个基因的富集效率 (ChIP样本相对于Input样本)。结果显示, Tri-Methyl-Histone H3-K4 Rabbit pAb对各基因的富集效率都远高于阴性对照Rabbit Control IgG, 说明H3K4me3修饰在 *ATP1A1* 和 *GAPDH* 上存在富集。

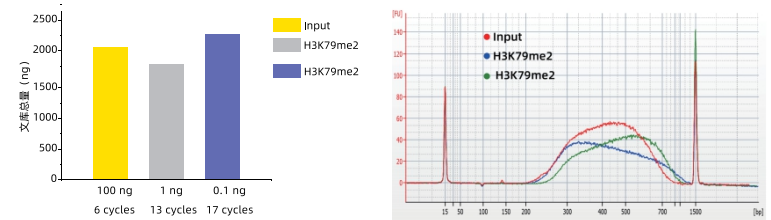
3.3 ChIP DNA测序文库构建

// 3.3.1 ChIP DNA量大于10 ng



取10 ng ChIP DNA使用Rapid Plus DNA Lib Prep Kit for Illumina V2试剂盒 (RK20255) 构建测序文库, 文库总量可达到1,000 ng左右。文库使用磁珠纯化后片段范围在200-1,000 bp, 主峰在450-500 bp左右。

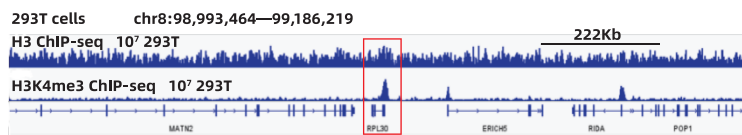
// 3.3.2 ChIP DNA量小于10 ng



ChIP DNA取1 ng 和0.1 ng 使用Scale ssDNA-seq Lib Prep Kit for Illumina V2试剂盒 (RK20228) 构建测序文库, 文库总量可达到2,000 ng左右。文库使用磁珠纯化后片段范围在200-1,000 bp, 主峰在450-500 bp左右。

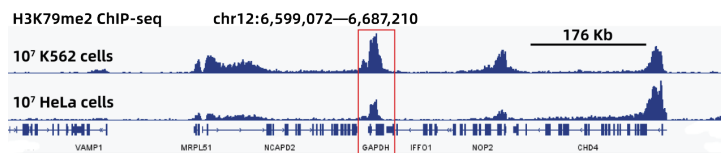
3.4 ChIP-seq测序peak

// 3.4.1 不同抗体的ChIP-seq peak



对 1×10^7 数量的293T细胞分别进行Histone H3 Rabbit pAb (A2348)和Tri-Methyl-Histone H3-K4 Rabbit pAb (A2357)抗体的ChIP-seq实验。图片展示了8号染色体上192Kb的一段代表性区域的富集情况，结果显示H3K4me3已知的靶基因RPL30在Tri-Methyl-Histone H3-K4 Rabbit pAb (A2357) ChIP实验中得到了明显富集。

// 3.4.2 不同细胞系的ChIP-seq peak



使用Di-Methyl-Histone H3-K79 Rabbit pAb (A2368)分别对 1×10^7 数量的K562和HeLa细胞分别进行ChIP-seq实验。图片展示了12号染色体上176 Kb的一段代表性区域的富集情况，结果显示H3K79me2的已知靶标基因GAPDH在Di-Methyl-Histone H3-K79 Rabbit pAb ChIP实验中得到了明显富集。

实验流程和注意事项

4.1 样本甲醛交联

大部分ChIP实验都需要进行交联，使DNA与相关蛋白质固定。甲醛是ChIP实验中最常用的交联剂，甲醛是一种非常活跃的小分子，很容易穿透细胞膜及核膜进入细胞核，通过醛基将DNA和蛋白质交联。同时甲醛的交联是可逆反应，通过加热的方式可以解除交联。

// 实验前准备

- 100X 蛋白酶抑制剂 (PIC) 和10X 甘氨酸溶液预热至完全溶解
- 配制含PIC的1X PBS 预冷
- 配制含1%的甲醛的 PBS 固定液

// 甲醛交联

- ① 培养好的细胞 ($1 \sim 2 \times 10^7$) 弃掉培养基，用预冷的1X PBS 漂洗2次。
- ② 加入新鲜配制好的含1%的甲醛的 PBS 固定液10 mL，室温放置10 min。
- ③ 加入1.1 mL 10X 甘氨酸溶液转动混匀，室温孵育5 min，终止反应。
- ④ 每个培养皿中加入2 mL 预冷1X PBS (含PIC)，将细胞刮下来，所有细胞收集到一个50 mL 锥形管中，4°C，1,000 g 离心 5 min 收集细胞，弃上清。（此处可暂停实验，弃上清的细胞可保存在-70°C冰箱）

// Tips

- ▶ 细胞生长状态会影响基因表达，可能会影响所研究的TF与promoter的结合。一般细胞长到75%-85%比较好。
- ▶ 甲醛交联之前，细胞尽可能减少人为处理。直接将甲醛加入培养基（甲醛终浓度为1%）中交联更好一些。
- ▶ 务必使用有效期以内、正确避光保存的分析或分子生物学级别的甲醛。
- ▶ 固定条件通常为室温（不要高于25°C）固定10 min，当DNA和靶点结合较弱时，可适当延长交联时间。
- ▶ 最好做预实验优化交联时间和温度。交联时间过长或温度过高会显著降低染色质超声破碎效率，且可能遮蔽ChIP抗体识别的表位。而交联不足可能导致蛋白质和DNA的解离。
- ▶ 悬浮细胞可以在培养基中直接加入甲醛（终浓度1%），注意确保培养基温度恢复到室温。
- ▶ 动物和植物组织样本需要切碎成1-2 mm³ 碎片，建议在真空下进行甲醛交联。

4.2 细胞核抽提和裂解

固定后的细胞可以直接裂解后进行超声处理打断染色质，但是更多的实验室都会选择在超声破碎染色质之前进行细胞核分离，分离的细胞核通过在更剧烈的裂解液缓冲液中裂解，这将有利于细胞核内染色质的释放和打断。DNA和蛋白质相互作用发生在细胞核中，去除胞浆蛋白可以减少背景，提高灵敏度。

//实验前准备

- 100X 蛋白酶抑制剂（PIC）溶液预热至完全溶解
- 配制1X Cell swelling Buffer（细胞裂解缓冲液）+ PIC + DTT
- 配制1X ChIP 超声缓冲液 + PIC

//细胞核抽提及裂解

- 1 使用1 mL 预冷的 1X Cell swelling Buffer + PIC+ DTT 溶液重悬细胞，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 沉淀细胞核。
- 3 再次用1 mL 预冷的 1X Cell swelling Buffer + PIC+ DTT 溶液重悬细胞，冰上孵育5 min。
- 4 4°C，5,000 g 离心5 min 沉淀细胞核。1 mL 或500 μL ChIP超声缓冲液 + PIC重悬细胞核，冰上孵育10 min。
- 5 将细胞核裂解样品转移到适宜超声的离心管中（如下表）。

超声仪类型	建议使用离心管	建议超声体积 (μL)
接触式探头超声仪	2 mL 体积离心管	500-1,000
非接触式超声仪	1.5 mL 体积薄壁管	300-500
	0.2 mL 体积薄壁管	50-150

//Tips

- ▶ 细胞核裂解后的样本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。
- ▶ 所用的缓冲液均需要加 PIC，且现配现用，新鲜使用。
- ▶ 整个操作需要在冰上。

4.3 染色质超声片段化

孵育抗体之前，需要将染色质打断成一定长度的小片段，常用方法包含超声和酶切两种。超声是目前使用更广泛的方法，通过物理作用将DNA的共价键打断，实现染色质片段化。在破碎DNA的同时，也会在一定程度上破坏蛋白和DNA之间的相互作用。因此，超声摸索应遵循适可而止的原则。

//实验前准备

- 接触式探头超声仪准备冰水混合物
- 非接触式超声仪提前降温到设定温度
- 配制 1%琼脂糖凝胶

//超声片段化及电泳检测

- 1 接触式超声仪建议使用3 nm 或 2 nm 直径的探头，设置50 W 功率，超声时间1 s，间隔时间1 s，超声总时间5-10 min（可根据实际情况设定）。建议最好先摸索超声条件，根据摸索条件进行染色质超声片段化。非接触式超声仪根据说明书设定合适条件（一般500 μL 样品功率可设定在 50-100 W 之间），合适超声循环和总运行时间。同样建议摸索超声条件。
- 2 超声结束后，4°C，12,000 g 离心10 min 去除细胞核碎片和不溶物。取50 μL 用于检测DNA片段大小。剩余样本保存在-70°C冰箱，避免反复冻融。
- 3 50 μL 样品加入100 μL 无核酸酶的水，然后加入6 μL 5 M NaCl 和2 μL RNase A，震荡混匀，37°C孵育30 min。
- 4 加入2 μL 蛋白酶K，震荡混匀，65°C孵育至少2 hr。
- 5 用柱式DNA纯化试剂盒纯化DNA，取10 μL 样本进行1%琼脂糖凝胶电泳以确定DNA片段大小。如果后续DNA仅用于qPCR分析，80~90%DNA片段范围在200~1,000 bp 即可，如果后续是通过NGS进行分析，那DNA片段范围在 200~500 bp 较好。
- 6 对纯化后的DNA测定浓度，理想的DNA浓度范围在50~200 ng/μL。

//Tips

- ▶ 超声体积过大会降低片段化效率，可将样本分成多管超声，超声后再合成成一管。
- ▶ 超声时染色质浓度越高，DNA越不容易被打断，建议细胞量控制在 1×10^7 /mL 左右。
- ▶ 不同类型细胞超声效果也会有差异，相对于肿瘤细胞，原代细胞及组织染色质超声会更困难。
- ▶ 溶液中SDS浓度越高，染色质越容易被打断。
- ▶ 超声后DNA片段太大，会影响IP效率和ChIP分辨率；DNA片段太小虽然可以提高分辨率，但也会影响qPCR和建库测序。超声过度也会破坏抗原表位及蛋白质-DNA之间的相互作用。因此，超声条件摸索应遵循适度原则。

4.4 免疫沉淀

抗体是决定ChIP实验成功的关键因素，抗体如果选择不当，很可能导致实验结果失败。多克隆、单克隆和重组抗体都可以用于ChIP实验，但不是所有抗体都适合做ChIP实验，最好只考虑ChIP/ChIP-seq验证过的抗体。

//实验前准备

- 100X PIC 预热至完全溶解
- 10X 染色质免疫沉淀缓冲液预热至完全溶解
- ChIP 洗脱液预热至完全溶解
- 配制足量1X 染色质免疫沉淀缓冲液，并加入 PIC
- 配制1X 低盐漂洗液，每个反应准备2 mL
- 配制1X 高盐漂洗液，每个反应准备2 mL
- 配制1X LiCl洗剂液，每个反应准备2 mL
- ChIP级A/G磁珠每个反应准备30 μ L

//免疫沉淀

- 1 根据实验设计确定免疫沉淀反应总数，包含实验组（目的抗体）、阴性对照组（同型IgG抗体），对于初次进行ChIP实验，推荐加一个阳性对照组（常用组蛋白H3抗体）。
- 2 染色质用1X 染色质免疫沉淀缓冲液进行1:4比例的稀释，每个IP反应加入等量样本（10-15ug 总量DNA对应的体积），若体积不足500 μ L，加1X 染色质免疫沉淀缓冲液补足。取25 μ L 作为5% Input对照样本，暂时保存在-20°C冰箱。
- 3 每个IP反应分别加入目的抗体、IgG抗体、H3阳性抗体等，抗体量为2~5 ug，在4°C的转子上孵育至少3 hr（不建议过夜）。
- 4 上一步反应液10,000 g 离心10 s，溶液全部转移到对应标记的A/G磁珠管中，在4°C的转子上孵育2 hr。
- 5 样品置于磁力架上，静置1~2 min，溶液澄清后小心吸走上清。该上清可以保留，以备查找问题时使用。
- 6 加入1 mL 低盐缓冲液重悬磁珠，在4°C的转子上孵育5 min，置磁场1~2 min，溶液澄清后小心吸走上清。
- 7 加入1 mL 高盐缓冲液重悬磁珠，在4°C的转子上孵育5 min，置磁场1~2 min，溶液澄清后小心吸走上清。
- 8 若预实验发现抗体非特异性吸附较强时，可以用1 mL LiCl 洗剂液重悬磁珠，在4°C的转子上孵育5 min，置磁场1~2 min，溶液澄清后小心吸走上清。
- 9 加入1 mL TE缓冲液，涡旋震荡重悬磁珠，置磁场1~2 min，溶液澄清后小心吸走上清，重复一次。

//Tips

- ▶ 设置好重复实验。可以设置生物学重复或技术重复。
- ▶ 设置好对照组实验。阴性对照常用抗体同型IgG或标签抗体加入只有标签蛋白载体的样本。

- ▶ Input是指没有加抗体的对照，主要目的是消除背景噪音，ChIP-seq的背景噪音来自多方面，比如异染色质因为结构复杂片段化效果稍差，相对来说更难得到富集。此外可以根据Input中靶序列的含量，按照样本量比例计算ChIP的富集效率考察抗体是否高效、特异。
- ▶ 抗体选择非常重要，不是所有抗体都适合做ChIP实验，在WB验证中表现很好的抗体，也可能不适用于ChIP。优先考虑那些专门为ChIP验证过的抗体。

4.5 解交联及纯化DNA

在获得ChIP DNA之前必须对蛋白和DNA解交联，通常通过加热孵育和用蛋白酶K消化来完成。ChIP实验后获得的DNA需要经过纯化后才能满足后续的qPCR或者NGS测序的需要，常用的回收方式是柱法回收，即将DNA吸附在硅基质膜上，经过溶液漂洗和洗脱获得高纯度DNA。

//实验前准备

- 蛋白酶K预热至完全溶解
- 柱纯化漂洗液PW中加入无水乙醇

//解交联及DNA纯化

- 1 150 μ L ChIP洗脱缓冲液重悬磁珠，5% Input样品中加入125 μ L ChIP洗脱缓冲液，65°C孵育30 min，每隔5 min 涡旋震荡混匀。10,000 g 离心10 s，置磁场1~2 min，小心将洗脱下来的染色质上清转移到新的EP管中。
- 2 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，在65°C孵育30 min。
- 3 加入5倍体积的结合液PB至上一步反应体系中，溶液全部转移至平衡好的纯化柱中，室温平衡2 min，12,000 rpm离心 30~60 s，弃掉溶液。
- 4 吸附柱中加入 600 μ L 漂洗液 PW，静置2~5 min，12,000 rpm离心 30~60 s，弃掉溶液。重复操作一次。
- 5 空吸附柱12,000 rpm 离心2 min，尽量除去漂洗液。打开管盖室温放置2~3 min，彻底晾干。
- 6 将吸附柱放入一个新的离心管中，向膜中央位置悬空滴加50 μ L 洗脱缓冲液 EB，室温放置2 min，12,000 rpm 离心2 min 收集DNA溶液。DNA用Qubit检测浓度，样品可以保存在-20°C冰箱。

//Tips

- ▶ 吸附柱使用前需要用 BL 溶液平衡，使用当天处理过的柱子。
- ▶ 吸附柱最大体积是800 μ L，若样本体积过大，可多次加入。
- ▶ 漂洗溶液中乙醇的残留会影响后续的酶反应实验。

4.6 ChIP DNA qPCR检测富集效率

ChIP实验的最后一步是分析免疫沉淀的DNA，如果靶位点已知且不是很多，可以使用qPCR进行分析。在ChIP-qPCR之前，需要根据蛋白结合的具体位置，设计靶点基因特异性的引物。

//实验前准备

- 设计、合成引物
- qPCR试剂解冻

//qPCR检测

- 1 实验设置Input、阳性对照（H3抗体）、阴性对照（IgG抗体）、实验组（目的抗体）、空白组（水）。Input 样本进行4~5倍稀释。
- 2 每组样本取2 μL 作为模板，加入10 μL 2X qPCR Master Mix+2 μL 引物，补水至总体积20 μL。
- 3 设置 qPCR 反应程序，通常采用二步法，40个循环。
- 4 程序运行结束后，利用以下公式计算 ChIP 富集效率。
- 5 Percentage of Input = $X\% \times 2^{(CT[Input\ Sample] - CT[IP\ Sample])}$ ，例如：2% Input, $CT\ Input=23$, $CT\ IP=26$, $\% Input=2\% \times 2^{(23-26)}=0.25\%$ 。

//Tips

- ▶ 设计阳性对照区域和阴性对照区域引物。
- ▶ 使用热启动聚合酶以减少非特异性PCR产物。
- ▶ 引物选择符合PCR引物设计的一些标准，如长度、Tm值、GC含量、扩增片段长度、特异性。
- ▶ 验证转录因子在启动子区域的结合，可以先确定转录因子潜在的结合位点，可以通过查阅文献、预测软件等，确保设计的引物扩增产物能够横跨预测的潜在结合位点。
- ▶ 组蛋白修饰的引物扩增范围要求相对宽松，只要扩增产物能够位于启动子或基因转录区域即可。
- ▶ 当抗体对特定基因位点的富集效率相对于IgG高8-10倍以上时，可以认为ChIP结果为阳性。

4.7 ChIP DNA 构建测序文库

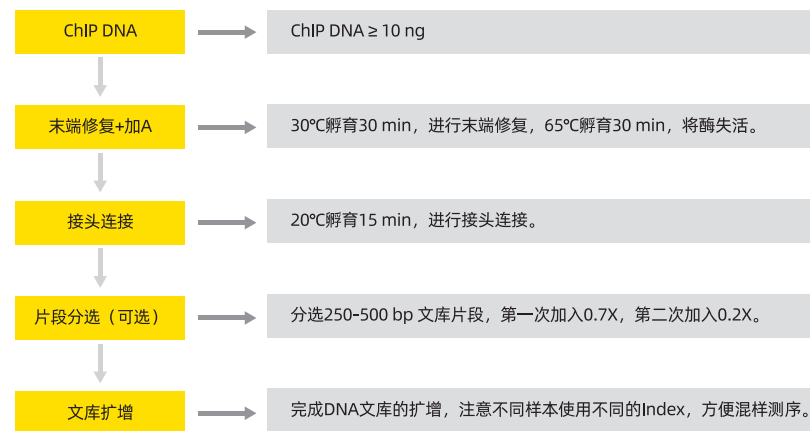
核内大部分DNA结合蛋白表达丰度较低，而且细胞核内构象动态变化，染色质交叠、凝聚，可能会覆盖住大量抗体结合位点，导致ChIP实验具有很大难度，一般富集到的DNA总量都在ng级别，转录因子则更低，这极大的影响了ChIP-seq建库的成功率。为了适应ChIP DNA起始量的变化，ABclonal致力于测序建库试剂的升级和拓展，提供2种文库制备方案。当ChIP DNA ≥ 10 ng 时，建议使用常规双链DNA建库试剂盒Rapid Plus DNA Lib Prep Kit for Illumina or MGI V2。若ChIP DNA < 10 ng 时，可选择单链建库试剂盒Scale ssDNA-seq Lib Prep Kit for Illumina V2。

//4.7.1 普通双链DNA建库试剂盒

//实验前准备

- 建库Kit中试剂在冰上解冻
- 文库纯化和筛选的磁珠提前30 min 室温平衡
- DNA样本根据建库Kit要求取相应的量和体积
- 准备新鲜配制的80%无水乙醇

//建库操作



//Tips

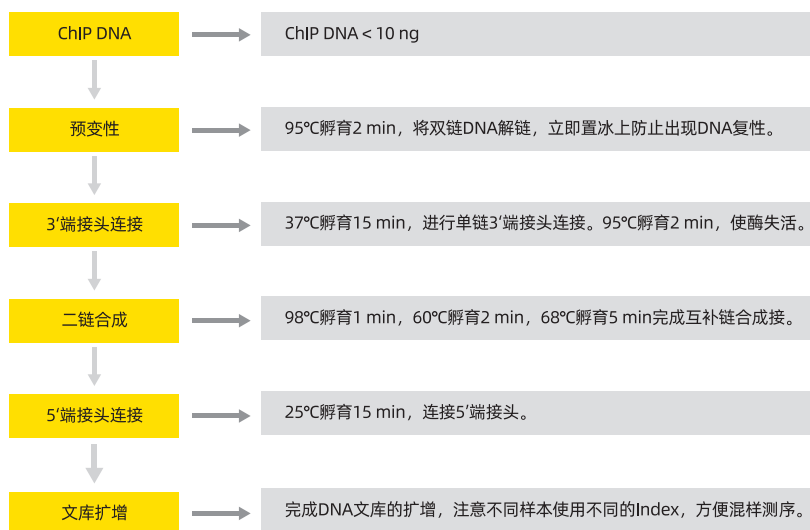
- ▶ 接头连接后的产物可以用DNA磁珠进行一次纯化，也可以通过2次磁珠纯化筛选出一定范围内的DNA片段。
- ▶ 接头可以选择长接头或短接头，PCR扩增时选用相对应的引物。

//4.7.2 单链DNA建库试剂盒

//实验前准备

- 建库Kit中试剂在冰上解冻
- 文库纯化和筛选的磁珠提前30 min 室温平衡
- DNA样本根据建库Kit要求取相应的量和体积
- 准备新鲜配制的80%无水乙醇

//建库操作



//Tips

- ▶ 当DNA模板浓度很低时, 可以扩大预变性反应体积。
- ▶ 接头连接后的产物可以用DNA磁珠进行一次纯化, 也可以通过2次磁珠纯化筛选出一定范围内的DNA片段。
- ▶ DNA建库效果不理想, 出现接头二聚体, 可以在PCR后, 使用1X 磁珠进行二次纯化。

文库QC和送测序

测序前对文库进行QC 是保证测序数据质量的重要环节。文库QC一般包括使用Qubit 确定文库浓度, 通过微流控片段分析仪 (Qseq或2100) 确认删掉文库的大小分布。

//实验前准备

- 准备 Qubit 检测试剂
- 安捷伦 2100 检测试剂冰上解冻

//文库定量和片段大小检测

- 1 用Qubit对文库进行定量, 若文库浓度大于3 ng/μL 以上, 可以上机测序。若文库浓度低于3 ng/μL, 是否可以上机测序, 需咨询测序服务供应商。
- 2 用安捷伦2100和Agilent High Sensitivity DNA Chip (Cat# 5067-4626)进行文库片段大小检测。
- 3 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。文库送样体积≥15μL, 混合文库浓度≥3 ng/μL。文库类型为DNA文库, 数据量每个样本10 G以上。

//Tips

- ▶ 合格的文库2100结果应该呈现出单一的、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100 bp 的是引物二聚体, 长度在120 bp 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, 在成簇时存在优势扩增, 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。因此, 文库中二聚体污染越少越好。
- ▶ 文库混样可以按照混好的文库共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, 补水至总体积20 μL。如4个文库混库的话, 各取25 (100/4) ng 的DNA混合, 补水至总体积20 μL。
- ▶ 文库混样也可以将所有文库稀释成5 ng/μL, 再取适量体积的文库混合成一个文库。浓度低于5 ng/μL 的文库不进行混库。混合后的文库取1 μL 用Qubit进行浓度检测, 浓度应该在5 ng/μL 左右。

数据分析

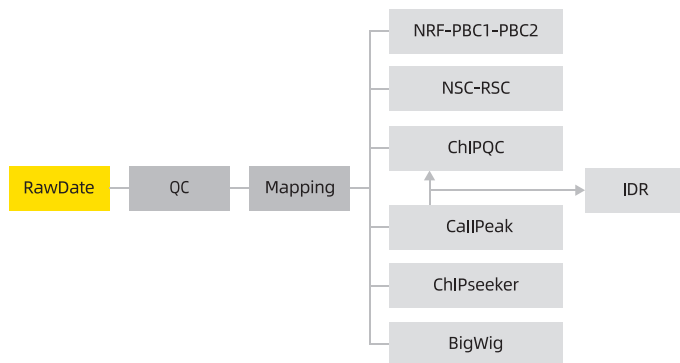
ChIP-seq的数据分析一般包括fastQC, mapping, peak-calling, peaks注释等, 高性能计算机平台、专业的分析软件和高质量的大样本数据库是有效分析数据的三要素。

//实验前准备

- 测序原始数据
- 服务器
- 分析流程

//分析

分析流程图



- 1 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。
- 2 使用bwa软件对于质控后的数据进行Mapping比对。
- 3 使用macs2软件进行CallPeak。运行结束后进行对Peak的分级统计。
- 4 使用R包ChIPQC进行统计。
- 5 NRF_PBC1_PBC2指标统计。
- 6 NSC-RSC指标统计。
- 7 使用R包ChIPseeker进行Peak的注释绘图。

附录：常见问题和解决方案 Common problems and Solutions

详情解答请参见—17、18页

- 1.什么是染色质免疫沉淀 (ChIP) ?
- 2.针对转录因子和组蛋白的ChIP技术操作上有哪些区别?
- 3.ChIP实验中超声破碎打断染色质温度不易控制, 可能会使蛋白质变性, 影响ChIP结果, 如何进行优化?
- 4.超声处理和酶解染色质之间有什么差异?
- 5.染色质为什么要片段化? 片段化的DNA长度为什么是200-1,000 bp? 片段化过度或不足对实验会有什么影响?
- 6.如何选择高特异性的ChIP级别抗体?
- 7.如果没有ChIP级别抗体改怎么选择?
- 8.免疫沉淀中琼脂糖珠和磁珠有什么区别?

详情解答请参见—19、20页

- 9.免疫沉淀中Protein A和Protein G的磁珠区别是什么, 该如何选择?
- 10.什么样的富集效率或倍数被认为是阳性的结果?
- 11.ChIP DNA检测在什么情况下用qPCR反应? 什么情况下NGS测序?
- 12.如何判断ChIP是否成功?
- 13.ChIP实验常见问题及解决方案

1.什么是染色质免疫沉淀（ChIP）？

染色质免疫沉淀（Chromatin immunoprecipitation, ChIP）是体内用来确定与某一特定蛋白结合的DNA序列技术。我们将“染色质免疫沉淀”拆成“染色质”、“免疫”和“沉淀”3个词来解释。“染色质”是由DNA和蛋白质组成的物质；“免疫”是指用商业化或自制抗体和染色质中蛋白质结合，形成复合物；“沉淀”就是通过沉淀的方法来分离将所形成的DNA-蛋白质复合物。因此，ChIP技术就是“利用染色质中蛋白质和外源抗体的特异性结合，将染色质沉淀下来并进行分离”。分离染色质的作用是为了拿到其中的DNA，因为蛋白质是已知的，染色质中的DNA是未知的，ChIP最终的目的就是进行DNA检测（qPCR或NGS测序）。

2.针对转录因子和组蛋白的ChIP技术操作上有哪些区别？

转录因子在染色质中表达水很低，往往是瞬时表达，组蛋白表达相对较高，也比较稳定。所以组蛋白研究起来更为容易，通常 10^5 - 10^6 个细胞即可完成一个ChIP反应；而转录因子的ChIP至少需要 10^7 个细胞。转录因子空间结构比较大，可能会结合多个核小体，不太适合使用酶法处理，酶法的消化位点多是在核小体的连接处，有可能将核小体断裂的同时打断转录因子与DNA的结合，建议使用超声断裂染色质。

3.ChIP实验中超声破碎打断染色质温度不易控制，可能会使蛋白质变性，影响ChIP结果，如何进行优化？

ChIP中的超声实验优化一般从如下几个方面考虑：

- (1) 对文献中的超声方案需要进行优化，尤其是当所使用的仪器与文献中所使用的不同时。
- (2) 在使用探头超声破碎仪时，选择一个适合样本体积的探头。
- (3) 超声参数应根据实际样品体积、细胞密度和细胞类型进行优化。
- (4) 优化包括超声功率、超声时间、间隙时间以及获得理想片段范围所需要的总时间，每一次只优化一个参数。
- (5) 始终保持裂解液冰冷，间断超声，因为超声处理产生热量会使染色质变性。
- (6) 超声过程中避免产生气泡，泡沫会导致蛋白质表面变性，可能使染色质损失在气泡中。

4.超声处理和酶解染色质之间有什么差异？

超声破碎是一种更传统的方法，使用声能来强力剪切染色质。超声处理的染色质非常适合用于进行ChIP。酶消化使用微球菌核酸酶来切割核小体之间的连接区域，可以温和地破裂染色质，保留染色质和结合蛋白的完整性。

5.染色质为什么要片段化？片段化的DNA长度为什么是200-1,000 bp？片段化过度或不足对实验会有什么影响？

染色质片段化的目的是确保蛋白质-DNA复合物可溶，能被ChIP抗体接近和结合。一般ChIP qPCR的DNA片段大小在200-1,000 bp，而ChIP-seq的DNA片段化大小在200-500 bp较好。如果小于200 bp，蛋白结合位点可能被打断，因为每个核小体结合DNA长度为175 bp，加上核小体间的linker DNA序列，核小体结合DNA最小序列大概在200 bp左右。如果片段长度大于1,000 bp，所要研究的目的蛋白结合位置会离目标序列有700 bp的距离。片段化过度可能会破坏抗原表位，降低PCR效率。

6.如何选择高特异性的ChIP级别抗体？

ChIP实验中抗体的选择是实验成功的核心要素。文献报道通过斑点杂交和ChIP-chip试验检测，分别只有73%和78%的抗体具有较好的特异性。针对这种情况给大家推荐一个抗体应用数据查询网站 (<https://www.citexs.com/>)。

7.如果没有ChIP级别抗体该怎么选择？

ChIP级别的抗体数量非常有限，所以当没有ChIP级别抗体时，我们可以有如下3种方法考虑：

- (1) 选择IP/IHC/ICC级别抗体进行尝试，这些实验中抗体识别的是蛋白质天然结构，和ChIP抗体识别较为相似。不建议尝试Western blot抗体，因为WB抗体识别的是蛋白质变性结构，并不适合ChIP实验。
- (2) 可以尝试跨物种使用抗体，将蛋白质序列在NCBI上进行Blast，如果同源性超过80%可以尝试。
- (3) 可以使用标签抗体，需要设置好对照，包括未转染细胞的mock IP对照，标签在N端转换到C端的对照。

8.免疫沉淀中琼脂糖珠和磁珠有什么区别？

琼脂糖珠的优势是价格便宜，高荷载量，但是需要离心，时间长，珠子在离心过程中可能破裂。琼脂糖珠存在非特异性结合，需要预处理，除去可能与琼脂糖珠非特异性结合的蛋白质和DNA。另外琼脂糖珠分层不明显，易损失样本。磁珠的优势是无需离心，操作时间短，磁珠表面光滑，背景低，不需要封闭。磁珠带颜色，分层明显，样本损失少。缺点是需要磁力架。因此在免疫沉淀中更推荐选择磁珠的方法。

9. 免疫沉淀中Protein A和Protein G的磁珠区别是什么，该如何选择？

Protein A与免多克隆抗体有更高的亲和力，而Protein G能与更广泛物种的抗体结合。推荐使用Protein A/G的混合型磁珠，能够为免疫沉淀提高最大的灵活性和特异性，不用考虑不同种属IgG亲和力差异。

10. 什么样的富集效率或倍数被认为是阳性的结果？

ChIP实验结果一般包含2个数据，富集效率（免疫沉淀的效率），富集倍数（蛋白质与DNA结合能）。富集效率是免疫沉淀样本比上Input样本的百分比，而富集倍数是特异性抗体比上阴性抗体获得的比值。这2个结果本身都是一个相对值，因此无论是富集效率还是富集倍数都只是一个相对结果，没有特定的数值。富集倍数的高低往往取决于目的蛋白质的丰度，目的蛋白丰度越高，靶点富集倍数越高，反之亦然。一些实验室常习惯上将8-10倍富集（目的抗体比上对照IgG抗体）作为实验成功的最低阈值。

11. ChIP DNA检测在什么情况下用qPCR反应？什么情况下NGS测序？

当我们已知蛋白质结合的DNA序列时，可以使用qPCR反应进行检测。qPCR除了要检测样本组外，还需要设置Input组、抗体阴性对照组和空白对照组。当蛋白质结合的DNA序列未知时，需要使用ChIP结合测序方法（ChIP-seq）。

12. 如何判断ChIP是否成功？

判断ChIP是否成功包含了2个层次的问题；

第一问题是整个实验是否Work？ 通常情况下，不管所用抗体是否ChIP级别，首先都建议验证一下抗体是否能做你的ChIP实验。如果是ChIP级别抗体，就严格按照说明书或者文章报道方法做；如果不是ChIP级别抗体，最好先确定抗体是否可以做IP实验，如果可行，那再进一步尝试是否可以用于ChIP qPCR检测，ChIP qPCR的引物设计可以根据文献报道，如果没有文献报道，可以通过预测目的蛋白可能的结合区域来设计引物。如果你是新手，可以同时做一个阳性对照，比如RNA pol II(对照转录因子)或H3(对照组蛋白修饰)。有时候确定抗体可以做ChIP，但是目的样本之前没有验证过，或者不确定目的蛋白结合区域，可以用文献报道过的样本作为对照，来确定ChIP是否成功。

第二问题是整个实验是否真的Work？ 这个时候需要做阴性对照，包括阴性抗体对照（同型IgG）和阴性区域对照（阴性对照引物）。阴性抗体对照用于排除DNA与抗体或者磁珠非特异性结合DNA，阴性区域对照排除目的蛋白结合背景DNA。可以通过qPCR比较目的蛋白在阳性区域和阴性区域的富集程度来判断ChIP是否成功，一般如果目的蛋白在阳性区域比阴性区域富集程度差异在8倍以下，认为ChIP没有成功，如果在8-10倍以上，可初步认为ChIP成功。

13. ChIP实验常见问题及解决方案

问题	可能的原因	改进建议
染色质样品浓度过低	细胞量太少	交联之前，对备用细胞计数确定实际所用的细胞数
	细胞核裂解不完全	在超声处理前后用显微镜观察，确保细胞核已完全裂解
超声后片段过长（大于 1,000 bp）	细胞交联过度	缩短交联时间
	细胞量太多	交联之前，对备用细胞计数确定实际所用的细胞数
超声后片段过小（小于 200 bp）	细胞量太少	交联之前，对备用细胞计数确定实际所用的细胞数
	超声条件过于苛刻	对超声功率、超声时间及超声总时间进行优化
阳性对照 H3 抗体免疫沉淀组 RPL30 基因 PCR 扩增没有条带	免疫沉淀中的染色质量太少	每个 IP 的染色质至少需要 20 μ g
	抗体加的太少	抗体增加至 10 μ g
	免疫沉淀反应时间太短	抗体与染色质孵育过夜，加入磁珠后再孵育 2 小时
阴性对照 IgG 免疫沉淀组和阳性对照蛋白 H3 免疫沉淀组在 PCR 中得到相近量的产物	染色质从磁珠上洗脱不完全	最佳的洗脱条件是将样品放在 65 $^{\circ}$ C 并经常混匀使磁珠悬浮在溶液中
	免疫沉淀中的染色质量太多	每个 IP 的染色质不超过 50 μ g
	抗体加的太多	抗体不超过 10 μ g
实验抗体免疫沉淀组没有 PCR 产物	PCR 体系中模板 DNA 过多	减少 PCR 体系中模板量
	PCR 循环数过多	降低循环数
	PCR 体系中 DNA 模板量不足	增加 PCR 反应中 DNA 模板量
	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 μ g 之间
所用抗体不适合免疫沉淀	更换抗体	