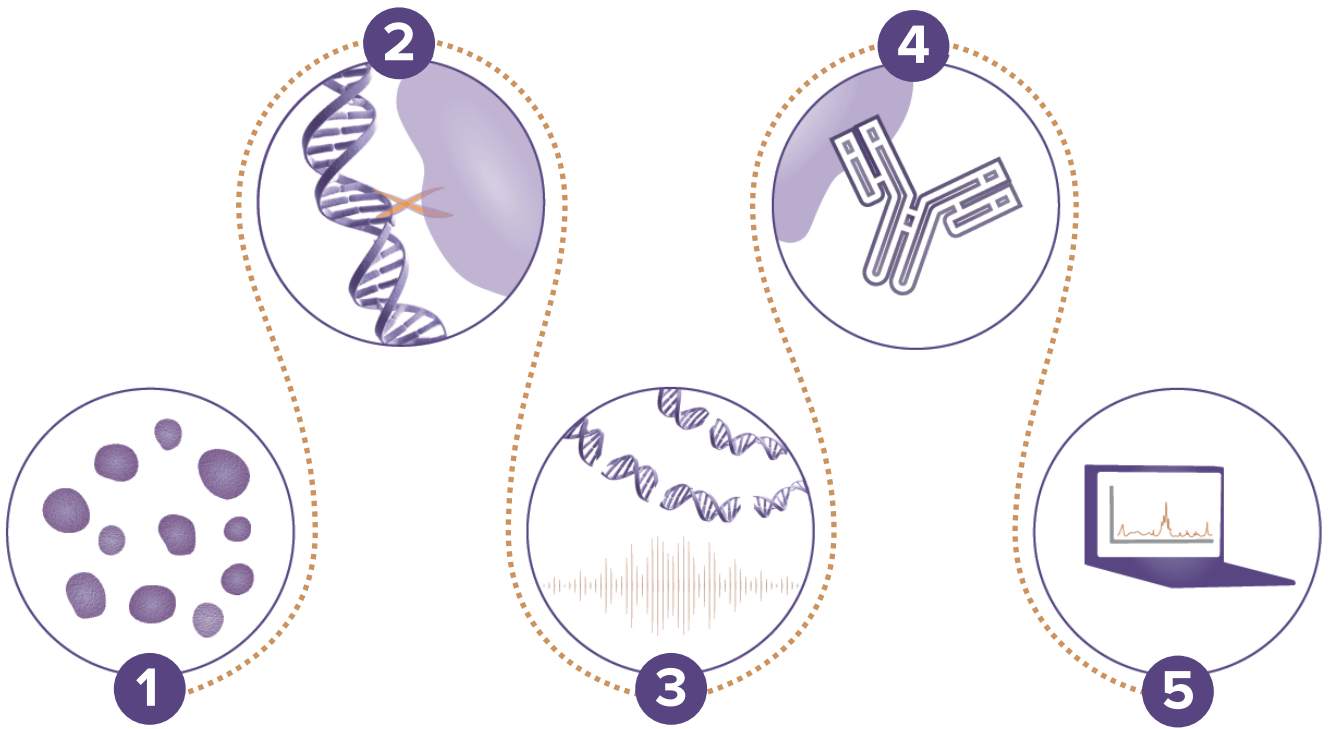


ChIP实验指南

ChIP ASSAYS GUIDE



目录

ChIP概述... 3

ChIP在表观遗传学中的应用... 4

ChIP实验关键步骤... 5

- ChIP实验样本的准备... 6
- 如何正确固定实验样本... 8
- 染色质片段化... 10
- IP反应... 12
- ChIP结果分析方法... 14

如何确定ChIP实验是否成功... 16

- 设立正确的对照... 16
- 通过富集度判断是否成功... 16

总结... 17

附录... 18

- 附录一：ChIP-qPCR引物的设计... 18
- 附录二：ChIP超声建议... 24
- 附录三：富集度的计算... 26

ChIP概述

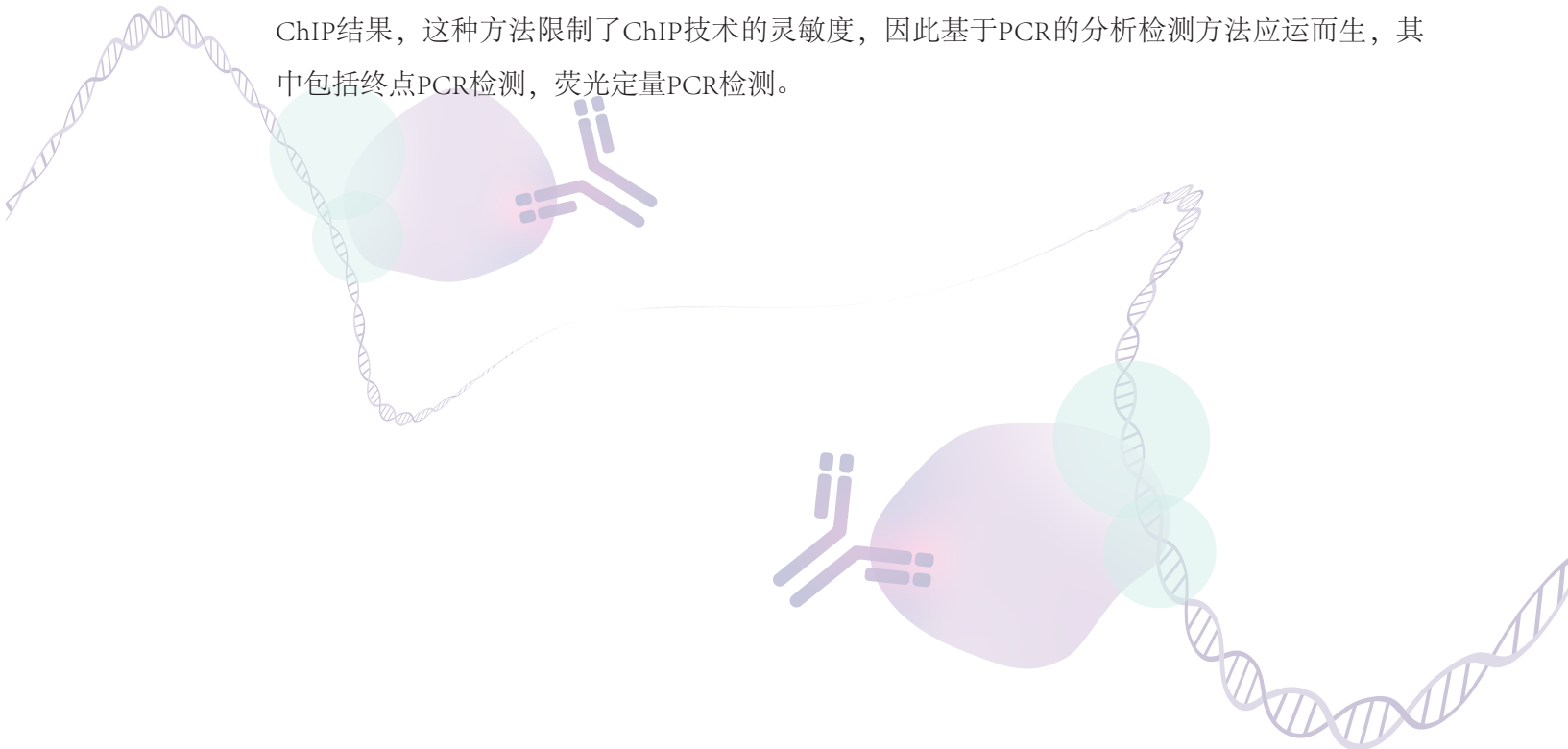
ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) 技术的主要目的是研究目的蛋白 (包括: 修饰组蛋白, 转录因子, 辅因子及其他染色质蛋白) 在染色质上的定位及丰度分析。

1993年James Broach在Genes&Dev上首次描述了染色质免疫共沉淀 (ChIP) 技术, 研究酵母中组蛋白乙酰化状态下的转录基因沉默。而此项技术第一次在哺乳动物细胞中成功还要归功于Richard Treisman课题组, 他们将成果发表在了1998年的Cell上。

从此ChIP走过了一段漫长的发展之路, 经过全球范围内无数个实验室, 不同物种样本的尝试, 才使得ChIP技术成为研究蛋白-DNA互作的经典实验方法。其下游分析也从终点PCR (endpoint-PCR) 发展到如今的高通量测序 (NGS, Next Generation Sequence) 。

ChIP实验的基础步骤是使用甲醛溶液将DNA和作用蛋白交联固定在一起后, 提取染色质并将染色质剪切到一定的片段大小, 再用染色质蛋白特异性抗体, 通过免疫沉淀富集感兴趣的染色质片段。

最初检测感兴趣的DNA是通过固定在硝化纤维素上并用与目标位点互补的DNA探针分析ChIP结果, 这种方法限制了ChIP技术的灵敏度, 因此基于PCR的分析检测方法应运而生, 其中包括终点PCR检测, 荧光定量PCR检测。



ChIP在表观遗传学中的应用

ChIP是研究表观遗传标记映射至基因组个别位点的主要技术，表观遗传学研究主要包括组蛋白与基因表达间的关系，或是研究非组蛋白蛋白与染色质作用如何影响了基因表达，如转录因子。

ChIP技术可以帮我们解答特异性修饰组蛋白或转录因子在染色质上是如何分布的，通过分析它们的染色质定位可以为解码目的蛋白的功能提供帮助。

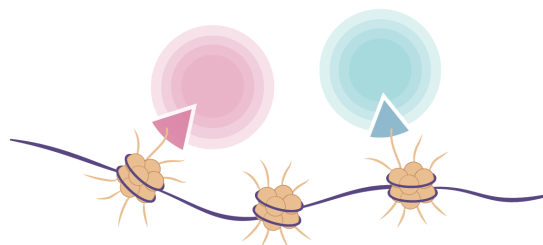
以组蛋白修饰为例，组蛋白H3的第四位赖氨酸三甲基化（H3K4me3）主要定位在转录活跃基因的启动子CpG岛上，这提示我们H3K4me3跟转录激活相关，而组蛋白H3K27me3主要分布在转录抑制的基因上，说明H3K27me3跟转录抑制相关。

另一方面，在转录调控研究中，如果我们知道某种转录因子定位在哪些基因的启动子上，便可知这个转录因子调控哪些基因表达，其丰度的多少可以揭示这种转录因子对不同基因的调控强度。

这都需要利用免疫共沉淀技术特异富集染色质位点。ChIP技术在实验层面上是非常具有挑战性的，许多因素都可能导致其失败，因此，最好使用经过良好验证的抗体和可靠的试剂来进行这些分析。

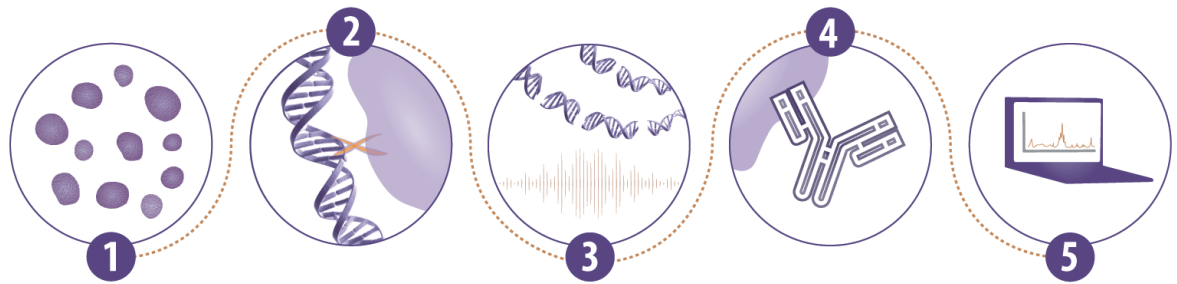
Active Motif 研发出了ChIP-IT®系列产品，针对不同实验因素，优化试剂和实验方法，使得ChIP实验灵敏度得到大幅提高。

- 提供实验全套解决方案，使实验轻松简单
- 选用protein G 包被的磁珠，使1天完成ChIP实验成为可能
- 低细胞，转录因子不再是ChIP实验道路上的阻碍
- 260多种ChIP级抗体



ChIP实验关键步骤

ChIP实验原理



ChIP实验过程步骤繁琐，想要得到好的ChIP结果，每一步都需要细心仔细。

其中，ChIP实验中有五个关键步骤尤为重要。

- 1. 起始样本：**每一个ChIP实验的开展，都离不开样本的选择，ChIP实验可使用细胞或组织样本。不同的样本对应的起始量也不同。
- 2. 交联固定：**通常进行ChIP实验时，细胞需要经过固定，保证蛋白与DNA的交联。大多数的实验方法都是采用甲醛进行细胞固定，但也有使用不同的固定条件和固定剂。
- 3. 染色质片段化：**制备片段化的染色质通常使用超声法，在一些条件下也会使用酶切法。
- 4. 免疫沉淀：**制备染色质后，下一步是实际的免疫沉淀（IP）步骤。使用的抗体是至关重要的，决定是否使用磁性或琼脂糖珠也是至关重要的。
- 5. 下游数据分析：**ChIP实验最后一步是数据的分析，通常是qPCR或者高通量测序。

ChIP实验样本的准备

ChIP实验可以使用多样的样本类型，如组织，细胞系，FFPE等。但传统ChIP实验的开展往往需要上百万的细胞或者大量的组织才能够满足需求，使得样本量成为了获得优良ChIP结果的一大阻碍。

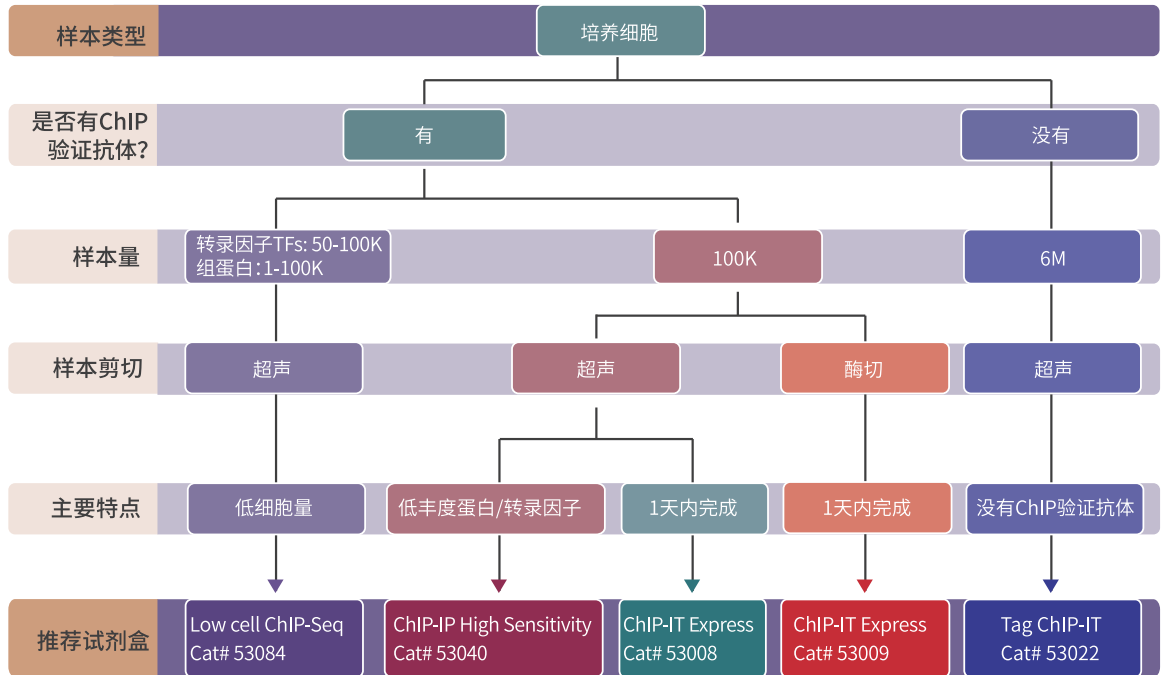
特别是对于某些样本类型，如原代细胞和干细胞，有时很难获得足够的细胞。再如一些特殊样本，如PBMC，或者石蜡样本，用传统的ChIP方法很难得到优良的数据结果。

这就需要针对不同的样本类型优化ChIP实验。最近，随着专为低细胞起始量ChIP试剂盒的开发，ChIP所需的细胞数量已经下降了很多。这些试剂盒已经开始允许研究人员使用几千而不是数百万的细胞进行实验，而且每天都有新技术问世，使细胞起始需求量进一步下降，如CUT&Tag技术（可在本书封底扫码Active Motif（中国）公众号，下载/申领《CUT&Tag完全指南》）。

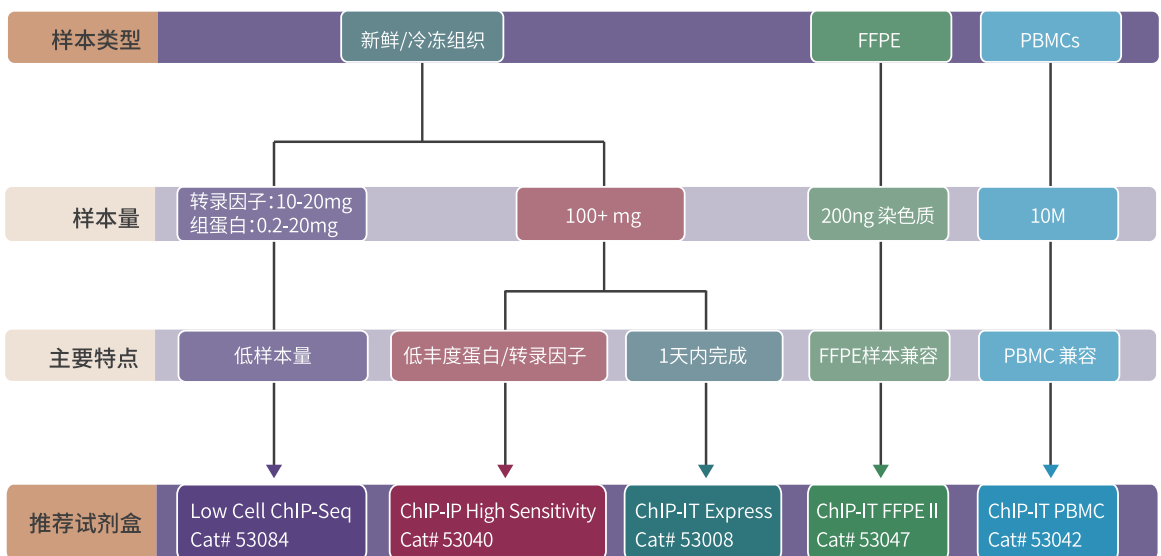
Active Motif基于不同ChIP实验的需求，研发出具有针对性的试剂盒产品。

ChIP试剂盒选择指南

培养细胞样本



组织样本或FFPE/PBMCs



* 带有磁珠的试剂盒都配有磁力条, 无需单独购买磁力架。

如何正确固定实验样本

ChIP实验可以使用许多不同的样品类型，所以ChIP实验的一个重要环节就如何处理样本，在大多数ChIP实验中，都需要固定环节，固定是为了将DNA与相关蛋白质交联，不同的细胞和组织类型需要不同的固定方案。需要考虑使用的何种类型的固定剂和固定时长。

ChIP技术用到的最主要的信息保存方式是甲醛交联，最早的ChIP技术并不是使用甲醛交联的，只是后来发现甲醛能更好的保存蛋白与DNA的信息，所以后来除了用于检测组蛋白修饰分布的Native ChIP以外，其他的ChIP基本上都需要用甲醛交联。

特点	缺点
活跃小分子，利于穿过生物膜	DNA与蛋白动态互动时间需大于5s
甲醛交联是可逆的	作用距离在2埃米内
将DNA碱基上的氨基/亚氨基与蛋白的碱性氨基酸上的氨基/亚氨基交联	目的蛋白与DNA作用区域若没有碱性氨基酸，两者则不能被甲醛所交联
	甲醛交联后可能会影响蛋白表位

在实际使用甲醛进行交联实验的时候，甲醛浓度和交联时间都是有严格要求的。

1. 一般的甲醛交联都选用1%的甲醛浓度，室温固定10-15分钟。时间太短的话，交联反应进行的不彻底，很多蛋白与DNA的结合不是很牢固，交联时间太长的话，会导致后续超声非常困难，而增加超声时间或功率会破坏目的蛋白本身的结构，进而导致ChIP结果不理想。

2. 为了尽可能保存细胞原始状态下的目的蛋白在染色质上的定位，甲醛交联之前，细胞需要尽可能少的被人为处理。可直接将甲醛加入培养基或将细胞培养基换成含有1%甲醛的PBS交联，这样会比胰酶消化细胞以后再交联效果更好。

3. 甲醛交联反应结束之后，需要马上加入相对甲醛过量的甘氨酸（一般甘氨酸终浓度为125 mM）与甲醛反应，终止交联反应。终止交联之后，样本需要经过PBS清洗（如果细胞数量比较少的话，可以在PBS里加入0.1%-0.5% NP-40，这样细胞在转移时不会粘在管壁或培养皿上）。

4. 组织的交联相比细胞交联要复杂一些。虽然甲醛可以很容易的透过细胞，但是大的组织块还是不太容易交联的很均一，大的组织块交联之前需要切成小块。但组织块并不是越小越好，组织块切的越小，细胞破坏的越严重。所以一般建议将组织块切成1-3 mm³大小。组织的交联时间一般可以延长到15 min，这样能保证组织的充分交联。

5. 考虑到甲醛并不能很好的交联距离大于2埃的DNA和蛋白，还有一些文献报道用分子长度更长的交联剂（一般是双官能团的亚氨酸酯类）配合甲醛对蛋白和DNA进行交联。比如，DTBP, DMA, DSG, DSP, EGS。

染色质片段化

样本固定后，必须对其进行裂解和超声处理，以产生可溶性染色质，用于免疫沉淀反应。一般染色质片段的期望大小在200到1000个碱基对之间，而想要得到好的染色质结果还需要考虑多个方面。

获得细胞核中固定的染色质

在固定之后，需要从细胞核中获得片段大小足够小的染色质，才能满足抗体有效结合沉淀。

虽然分离细胞核并不是一个绝对必需的步骤，但在片段化染色质之前，通过分离细胞核，改善ChIP结果不失为一个好的选择。Active Motif使用dounce研磨杵（cat#40401和40415）分离细胞核，将核分离作为ChIP实验的标准实验步骤。这是因为我们发现细胞核的分离是生成高质量数据的重要步骤。在细胞核被分离后，能够更轻松的获得可溶性染色质。

片段化染色质——哪一种方法才是最佳选择？

我们可以通过超声法或酶切法将染色质片段化。无论是超声或者酶切，都需要将染色质片段化至200-1000个碱基对范围内，要确保DNA片段不能过大或者过小。超声法作为经典的方法，被广泛的应用于ChIP实验，但针对不同的起始样本，需要对超声条件进行摸索和优化。

优化超声条件以获得最佳片段化效果

针对不同的样本类型，需要摸索对应的超声条件。但当某一细胞系，或者组织类型，确定其超声条件后，再次使用同类型样本时，可使用相同方法进行超声。另外，像一些细胞类型或组织由于其自身特性，也会对超声制备染色质造成困难。

样品制备本身有三个因素会对超声效果产生影响：

1. 超声用的buffer。这其中尤其以SDS的影响最大，SDS浓度越高，DNA越容易被打断。同时盐离子和其他去垢剂浓度都会对超声产生影响，一般认为盐离子或去垢剂浓度越高，DNA越容易被打断。

2. 细胞密度。超声时的细胞密度越高，DNA越不容易被打断。所以建议细胞密度应小于 10^7 cells/ml裂解液。

3. 细胞类型。不同细胞类型间，超声效果差异也很大。相对于常用的肿瘤细胞系，很多原代培养的细胞以及组织细胞的染色质超声破碎会更困难些。例如，T细胞往往很难进行超声检测，因为它们是非常小、紧密的细胞，很难打开，所以需要不同的溶解和超声条件才能实现最好的结果。

关于超声参数选择及优化技巧参见附录二（P24）。

使用酶切法获得片段化染色质

大多数研究人员更喜欢用超声波来切割DNA，因为它高效且随机，但用超声法也有其局限性，如需要专门的超声设备，或需要根据样本优化超声条件。一些研究者没有超声设备，或者希望以一种温和的方式处理DNA，这种情况下酶切法不失为一个好的选择，如使用微球菌核酸酶的剪切法（如MNase）。MNase是一种优先切割AT富集序列区域的酶，它可以在一段时间内生成所需大小的染色质片段。而让大多数科学家对酶切法产生顾虑的主要原因是其切割DNA具有偏好性。随着技术的发展，一些较新的染色质分析方法使用MNase与抗体结合，使得酶切法能够应用于较低的细胞起始量（CUT&RUN技术）。

使用酶切法片段化染色质处理不同类型样本时也需要对处理条件进行优化，主要包括酶的用量及处理时间的优化。

超声法	酶切法
无偏差随机打断，物理作用超声，无碱基偏好性	具有碱基偏好性，高GC含量或紧密结构DNA区域消化不完全，易造成酶切位点附近的核苷酸发生突变
超声所需设备成本较高，实验操作需有一定经验	酶切法成本较低，简单易上手
设备处理性能稳定，相同参数处理批次效应小	酶切法人工操作步骤多，需要计算酶浓度，样本浓度等，样本间批次效应较大
超声后片段若还大于所需片段大小，可继续超声至目的大小	终止反应后若片段不达标，可能需要重新计算或重做酶切实验
原理固定，只需调整超声时间，频率等参数即可。	不同的酶需要不同的试剂，和酶切条件，酶切原理和效果不一

IP反应

抗体是决定IP结果的关键

超声之后的IP过程是ChIP成功与否的关键。首先是抗体。适用于ChIP的最佳抗体一直是该领域的争论。多克隆比单克隆好吗？这不一定，这取决于细节。重组抗体的出现，使得争论进入新的层面，Active Motif现在正在以重组蛋白的形式生产抗体，与传统的单克隆抗体相比，重组蛋白抗体的一致性更高。

我们将在下面讨论每种类型的好处，以帮助您决定在实验中最好使用哪种类型。

The short answer is it's very difficult to say that one type of antibody is better than the others in all cases.

当涉及ChIP实验时，特异性其实比抗体类型更重要

为ChIP实验选择抗体时，最重要的是评估它是否在固定条件下以高度特异性识别靶标蛋白质，以及它是否能够经受长时间的IP和清洗步骤保持高结合力。在ChIP问世的早期，许多研究人员倾向于使用多克隆抗体，因多克隆抗体通常包含抗某一抗原的不同表位的抗体，包括一些变性的表位，所以，在固定的样本中多克隆抗体可能较单克隆抗体更具有优势。

然而现在有各种类型的抗体用于靶标蛋白，无论是单抗还是多抗，亦或是重组抗体，都需要满足以下几点要求：

1. 识别目的蛋白的立体表位。这跟做Western Blot的抗体是有区别的，因为WB的抗体识别的是蛋白的变性表位。
2. 识别甲醛交联后的立体表位。这跟做IP的抗体是有区别的。因为ChIP相对于IP需要甲醛交联的过程，甲醛会在DNA和蛋白质，以及蛋白和蛋白的氨基/亚氨基之间形成共价键，所

以ChIP级的抗体还要识别甲醛交联后的目的蛋白。这跟免疫荧光的抗体有点类似。

3. ChIP级的抗体跟目的蛋白有足够强的相互作用，能够耐受高盐，低盐及多种去垢剂（比如0.1% SDS，1% Triton X-100或NP-40）的清洗。

所以选择抗体时，最好选择文献报道可以用于ChIP实验的抗体，或抗体公司提供ChIP-qPCR或ChIP-seq数据的抗体。若靶标蛋白无ChIP级抗体，且未见有ChIP文章的发表，那么最好的办法就是寻找一种已经在交联实验中应用过的抗体（类似于ChIP实验的相关应用）。具体而言，如免疫荧光（IF）和免疫组织化学（IHC）是在固定条件下进行的，因此在这些分析中起作用的抗体很可能在ChIP实验中也可以使用。但值得强调的是，尽管抗体在IF或IHC的固定条件下可识别蛋白质表位，但ChIP实验过程中的其他因素可能会阻止抗体发挥良好作用。

ChIP过程使用的Buffer同样决定了IP的好坏

IP的另外一个关键因素是buffer，这包括binding buffer（超声用buffer）和wash buffer。

因为组蛋白与DNA的结合比较牢固，所以相对来说组蛋白修饰的ChIP更容易做，对buffer的要求也不是太严格。但是对于很多转录因子来说，因为本身跟DNA不是特别紧密（很多都是动态结合），在同一染色质区域，只有很少部分细胞可以捕获到目的蛋白和DNA的结合，所以通过合适的buffer将目的蛋白结合的DNA与背景DNA区分并分离出来就显得很关键了。

一般来说，选用的Buffer越剧烈，背景DNA去除的就会越干净，但同样的，目的DNA也会被更多的清洗掉。反之，选用的buffer越温和，目的DNA得到的就会越多，但同样的，背景DNA也就残留的越多。

对于去垢剂来说，离子型去垢剂（如SDS，SDC）比非离子型去垢剂剧烈得多。对于盐来说，剧烈程度LiCl>NaCl>KCl。去垢剂的选择，盐和去垢剂的浓度都会对ChIP效果产生很大影响。很多实验室或公司在这方面都有自己独到的buffer配方。

ChIP结果分析方法

ChIP实验的最后一步便是分析富集的DNA序列，研究人员通常通过PCR或NGS测序来研究他们分离的DNA序列。如果你已经知道你感兴趣的基因，那么使用qPCR进行分析是一个很好的选择。如果你想采取一种无偏差的方法，并需要确定基因组中转录因子或组蛋白修饰的所有位点，NGS测序更适合一些。

在高通量测序之前，需要将ChIP富集的DNA构建成测序文库。需要在DNA片段的两端接连上短的寡核苷酸（称为：adapter）以便测序仪器读取信息。有很多方法可以连接这些adapter，那么哪种链接方式更好呢？选择哪种方式连接adapter需要根据具体情况，保证最多的ChIP富集的DNA被保留下来，使用合适的adapter和清洗步骤。同时还需要保证最少的adapter形成的二聚体。这两个因素对于最优化生成的有用测序数据是不可或缺的。

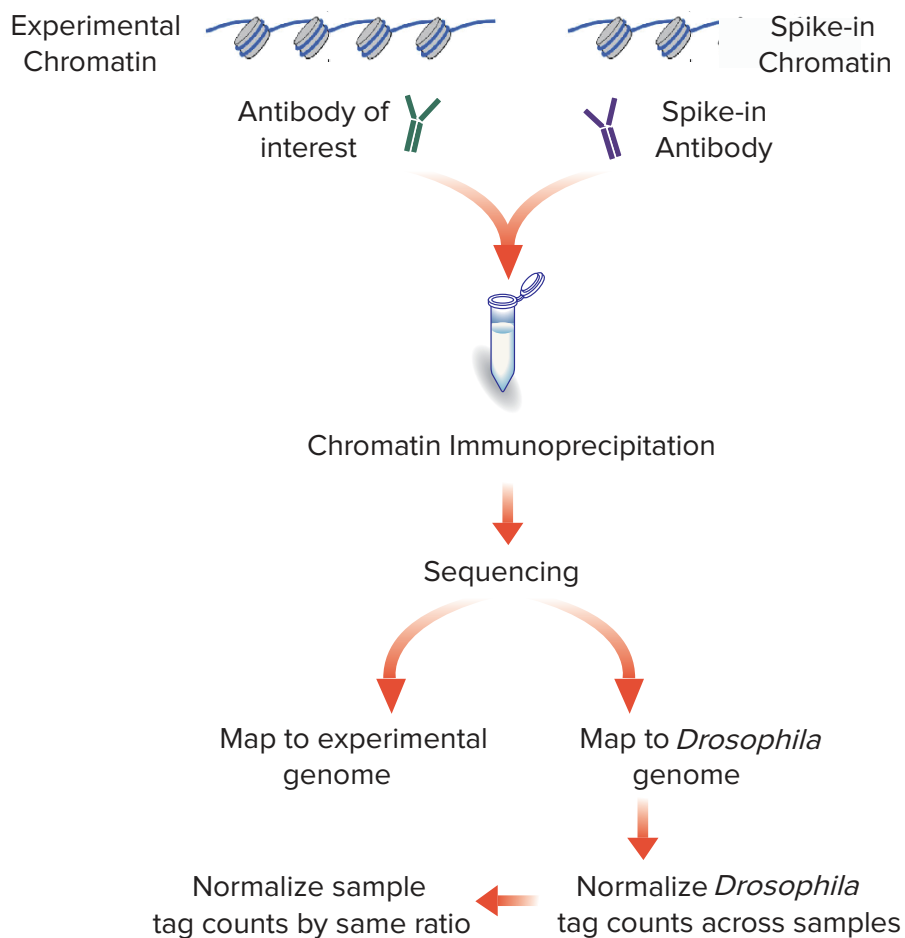
NGS分析提供了更多的DNA信息，但其难点在于需要更多的处理来生成NGS文库，以及需要生物信息学来解释结果。NGS测序相比于qPCR的分析更昂贵，但由于相对于qPCR产生的数据量大幅增加，该领域正越来越多地转向基于NGS的ChIP-seq分析，而且随着开源分析平台的产生，使得生物信息学变得越来越容易。但大多数ChIP-Seq项目都需要生物信息学科学家来完成最后分析并生成输出图，以帮助分析和可视化数据。

Spike-In技术消除样本间定量比较偏差

在数据分析过程中，往往需要样本间进行定量比较。Active Motif 与Constellation制药合作开发了用于ChIP-Seq的标准化数据校正技术，在Spike-in解决方案中，将少量Spike-in染色质（果蝇染色质）和抗体加入IP反应中，其他操作与常规ChIP相同，实验中引入的任何变量也会使Spike-in染色质数量相应发生变化。而由于Spike-in染色质数量在所有样本中应保持一致，可通过Spike-in染色质归一化分析，挖掘不同样本间的生物学差异。

ChIP-Seq Spike-in Normalization 优势:

- 减少实验误差的影响
- 发现常规ChIP分析无法观察到的细微生物学差异
- 广泛适用于不同抗体和样本
- Spike-in染色质和抗体可适用于任意ChIP试剂盒或实验方案
- qPCR和ChIP-Seq分析均可与之联合使用



Spike-in 原理流程图

如何确定ChIP实验是否成功

设立正确的对照

ChIP实验涉及的对照种类较多，包括阳性对照和阴性对照，每种对照又分别包括抗体对照和引物对照。各种对照的选择及作用见下方表格。

对照类型	描述	作用
阳性对照抗体	样本中丰富高，易做靶点的抗体。比如RNA pol II（用于对照转录因子）或H3K4me3（用于对照组蛋白修饰）	排除整个实验流程的问题，防止假阴性
阴性对照抗体（IgG）	IP使用抗体同种属来源IgG	排除抗体非特异性结合产生的假阳性
阳性对照引物	目的蛋白确定结合区域设计引物	初步判断目的片段是否成功富集
阴性对照引物	目的蛋白确定不结合区域设计引物	排除IP富集的背景DNA
Input	超声处理之后未经过IP的染色质样本	qPCR及NGS分析时作为参照

如果是新手，我们建议做一个阳性抗体对照ChIP，比如RNA pol II的ChIP（用于对照转录因子）或H3K4me3的ChIP（用于对照组蛋白修饰），确保整个实验体系没有问题。对于目的细胞样本，如果之前没有做过，而且不确定目的蛋白结合的区域，一般也可以用别人报道过的对照细胞株作为对照，与目的细胞样本同时做ChIP，确定ChIP是否成功。

通过富集度判断是否成功

需要说明的是，很多刚开始做ChIP的新手会以ChIP得到的DNA总量来判断ChIP好坏，这实际上是不正确的。很多测序公司会要求提供特定量的ChIP DNA用于建库，但是ChIP得到的DNA量跟ChIP成功与否没有直接关系，因为很多蛋白的ChIP得到的总DNA大部分为背景DNA。

一般只有通过ChIP-qPCR或ChIP-PCR验证才能确定ChIP成功与否。通过ChIP-qPCR判断ChIP成功与否是通过比较目的蛋白在阳性区域和阴性区域的富集度差异来判断的。

阳性区域比阴性区域富集度高4-8倍以下（也就是2-3个cycles），我们可以认为ChIP没有成功；如果在4-8倍以上，说明目的蛋白在阳性区域有富集，可以初步认为ChIP成功了，但具体还要依蛋白而定。比如H3K4me3的ChIP，通常阳性区域比阴性区域的富集度要高100倍以上才可以认为做的不错，但对于很多与染色质结合不是很紧密的蛋白，比如一些转录因子，可能富集度有10倍差异就不错了。一般对于已有报道的蛋白的ChIP，可以参考别人的报道来判断；而对于没有报道的蛋白ChIP，一般能做出有4-8倍以上的差异，就可以初步认为成功了。富集度计算详见附录三（P26）。

总结

ChIP实验有许多不同的步骤，这些步骤对实验的整体成功至关重要。当面对ChIP实验过程的多重挑战时，做好实验前期的设计与准备，选用经验证的ChIP级抗体，依据样品类型选用正确的ChIP试剂盒，并进行一些优化，可以使ChIP实验更加的得心应手。Active Motif为广大的实验工作者们提供完备的ChIP解决方案，种类繁多的ChIP级抗体，以及针对不同实验需求的ChIP试剂盒。

对于需要尽快获得最高质量ChIP-qPCR或ChIP-Seq数据的研究人员，我们也提供ChIP-Seq全套科研服务。有了这些服务，你只需将你的细胞或组织发送到Active Motif，你将在几周内收到分析数据。

欢迎登录Active Motif官方网站：www.activemotif.com查看详情，或联系我们。

附录

附录一：ChIP-qPCR引物的设计

无论是通过ChIP-qPCR来检测ChIP实验是否成功，为后续的建库和测序做准备，还是要通过qPCR的方式来检测蛋白与目标区域DNA的结合，正确的设计ChIP-qPCR引物会节省大量的时间和精力。

通常ChIP-qPCR的引物可以从已发表的高分文献中得到，但往往在研究新的靶标时，并没有参考文献，需要利用已有信息设计对应引物。

2016年Shirley Liu Lab推出的Cistrome Data Browser (<http://cistrome.org/db/#/>) 收集了来自GEO, ENCODE和Roadmap Epigenomics中已发表的人和小鼠ChIP-Seq数据，进行整理和分析并对其数据质量按照一套完整的质控参数进行评价，虽然这个数据库可以用来做更重要的事，不过在设计引物的时候参考可信度更高的ChIP-Seq数据，何乐而不为呢？

具体引物设计步骤

The screenshot shows the Cistrome Data Browser interface. At the top, there's a search bar with a 'Search' button and an 'Options' dropdown. Below the search bar, there are three filter panels: 'Species' (All, Homo sapiens, Mus musculus), 'Biological Sources' (All, 1-cell pronuclei, 1015c, 10326, 1064Sk, 106A), and 'Factors' (All, AATF, ABCC9, ACSS2, ACTB, ADNP). A tooltip for the 'Factors' panel indicates 'Samples passing peak quality controls' and 'Samples passing all quality controls'. Below the filters is a 'Results' table with columns: Batch, Species, Biological Source, Factor, Publication, and Quality Control. The table contains three rows of data, each with a checkbox in the 'Batch' column and a row of green circles in the 'Quality Control' column.

Batch	Species	Biological Source	Factor	Publication	Quality Control
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens	HEK293T; Epithelium; Embryonic Kidney	PHF8	Fortschegger K, et al. Mol. Cell. Biol. 2010	●●●●●●●●
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens	BG03; Embryonic Stem Cell; Embryo	H3K4me3	Guenther MG, et al. Cell Stem Cell 2010	●●●●●●●●
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens	BG03; Embryonic Stem Cell; Embryo	SMAD3	Mullen AC, et al. Cell 2011	●●●●●●●●

第一步，选择关注的物种，特定细胞/组织，组蛋白修饰/TF，并筛选通过所有质控指标的数据。单击选中一行数据，就可以在页尾看到这个数据的各种参数。

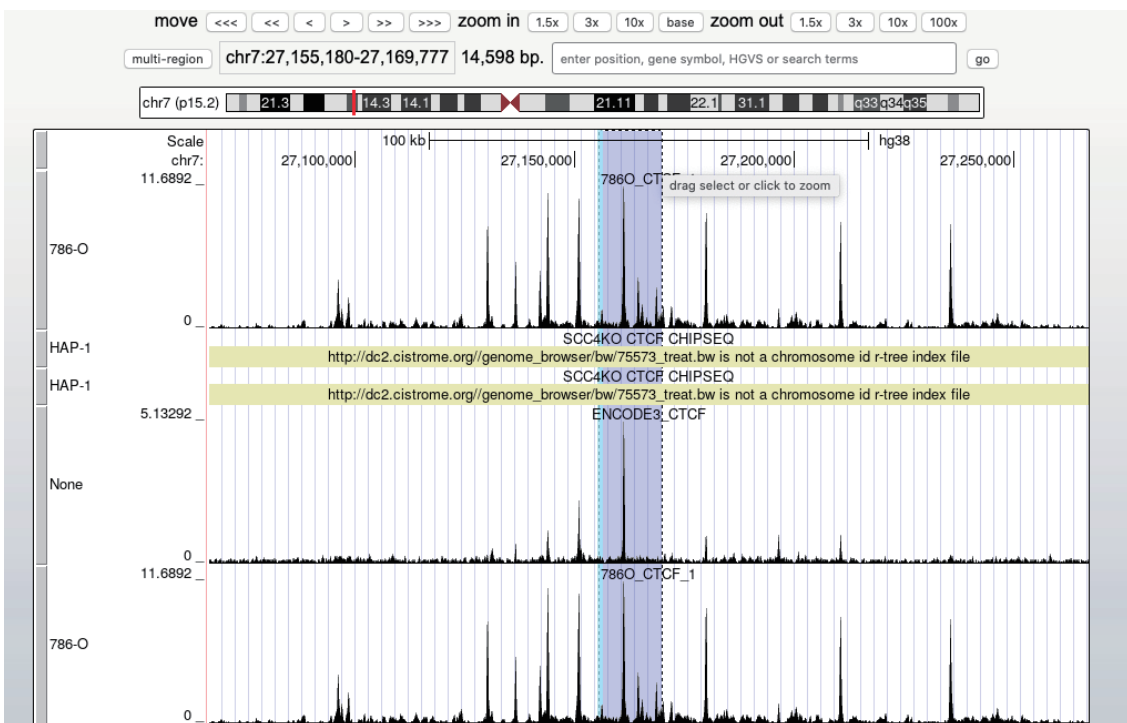


如图，这个ChIP-Seq的数据的各个质控参数优良，PBC>82%，表明建库过程中没有PCR bias。用Phastcon检测ChIP-Seq数据中结合位点的保守性，因为TF的DNA结合序列在物种间相对保守，这种中间峰值最高，两边对称降低的保守性分析结果，表明数据质量更为可靠，但组蛋白修饰并不一定遵循这一规律。

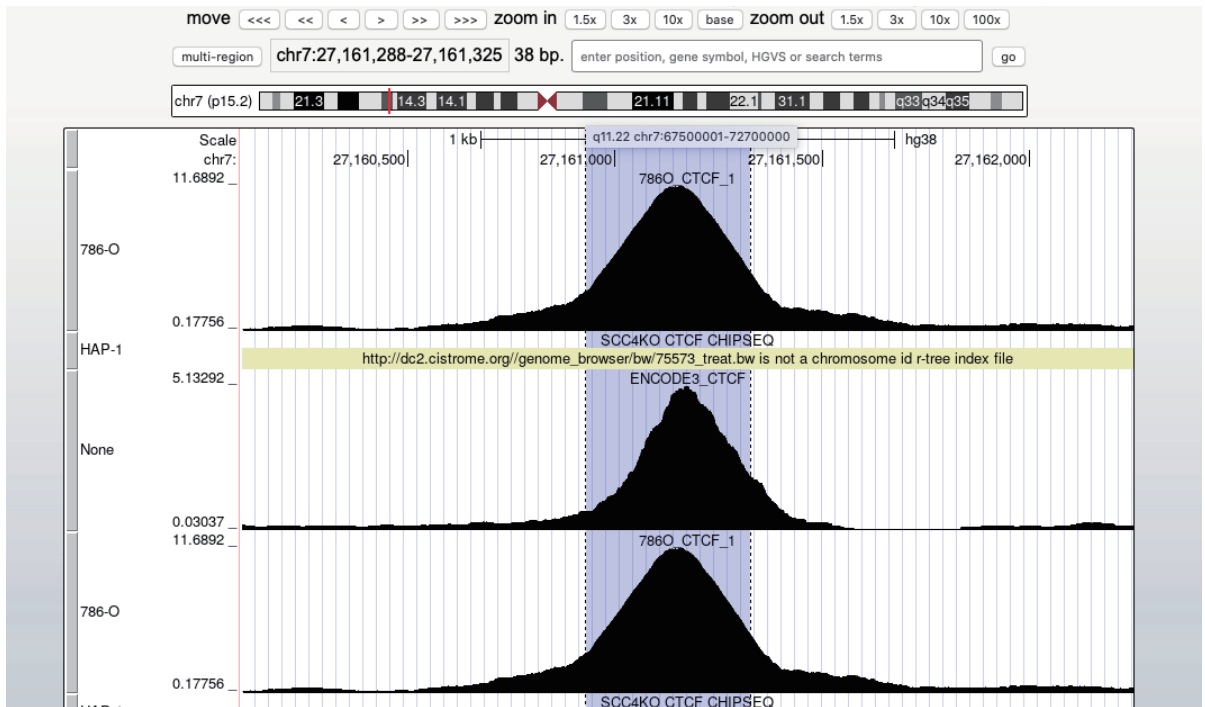
第二步，可以同时选几个ChIP-Seq数据，在UCSC中查看；

Results					
Batch	Species	Biological Source	Factor	Publication	Quality Control
<input type="checkbox"/>	Mus musculus	3T3-L1; Adipocyte	CTCF	Siersbæk R, et al. Mol. Cell 2017	●●●●●●
<input type="checkbox"/>	Mus musculus	IPSC; Retina	CTCF	Aldiri I, et al. Neuron 2017	●●●●●●
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens	HAP-1; Embryonic Stem Cell; Embryo	CTCF		●●●●●●
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens	786-O; Epithelium; Kidney	CTCF	Platt JL, et al. EMBO Rep. 2016	●●●●●●
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens	Spleen	CTCF	Davis CA, et al. Nucleic Acids Res.	●●●●●●
<input type="checkbox"/>	Mus musculus	Spermatid	CTCF	Pugacheva EM, et al. Genome Biol. 2015	●●●●●●
<input type="checkbox"/>	Mus musculus	Wehi-231; B Lymphocyte	CTCF	Peña-Hernández R, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2015	●●●●●●
<input type="checkbox"/>	Mus musculus	Mouse embryonic stem cells; Embryonic Stem Cell	CTCF		●●●●●●
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens	A549; Epithelium; Lung	CTCF	ENCODE Project Consortium, et al. Nature 2012	●●●●●●
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens	T47D; Epithelium; Mammary Gland	CTCF	Gertz J, et al. Mol. Cell 2013	●●●●●●
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens	Fibroblast; Connective Tissue	CTCF	Wang H, et al. Genome Res. 2012	●●●●●●
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens	GM13976; Lymphoblastoid; Blood	CTCF		●●●●●●
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens	AG04449; Fibroblast; Skin	CTCF	Wang H, et al. Genome Res. 2012	●●●●●●
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens	LNCaP; Epithelium; Prostate	CTCF	ENCODE Project Consortium, et al. Nature 2012	●●●●●●
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens	GM2588; Lymphoblastoid; Blood	CTCF	Kasowski M, et al. Science 2013	●●●●●●
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens	LNCaP; Epithelium; Prostate	CTCF	ENCODE Project Consortium, et al. Nature 2012	●●●●●●
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens	HCT-116; Colon	CTCF	Maurano MT, et al. Cell Rep	●●●●●●
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens	MCF-7; Epithelium; Breast	CTCF	Holding AN, et al. Elife	●●●●●●
<input type="checkbox"/>	Mus musculus	CD-1; Liver	CTCF	Matthews BJ, et al. Elife	●●●●●●
<input type="checkbox"/>	Homo sapiens	M.M.; Macrophage	CTCF	Heinz S, et al. Cell	●●●●●●

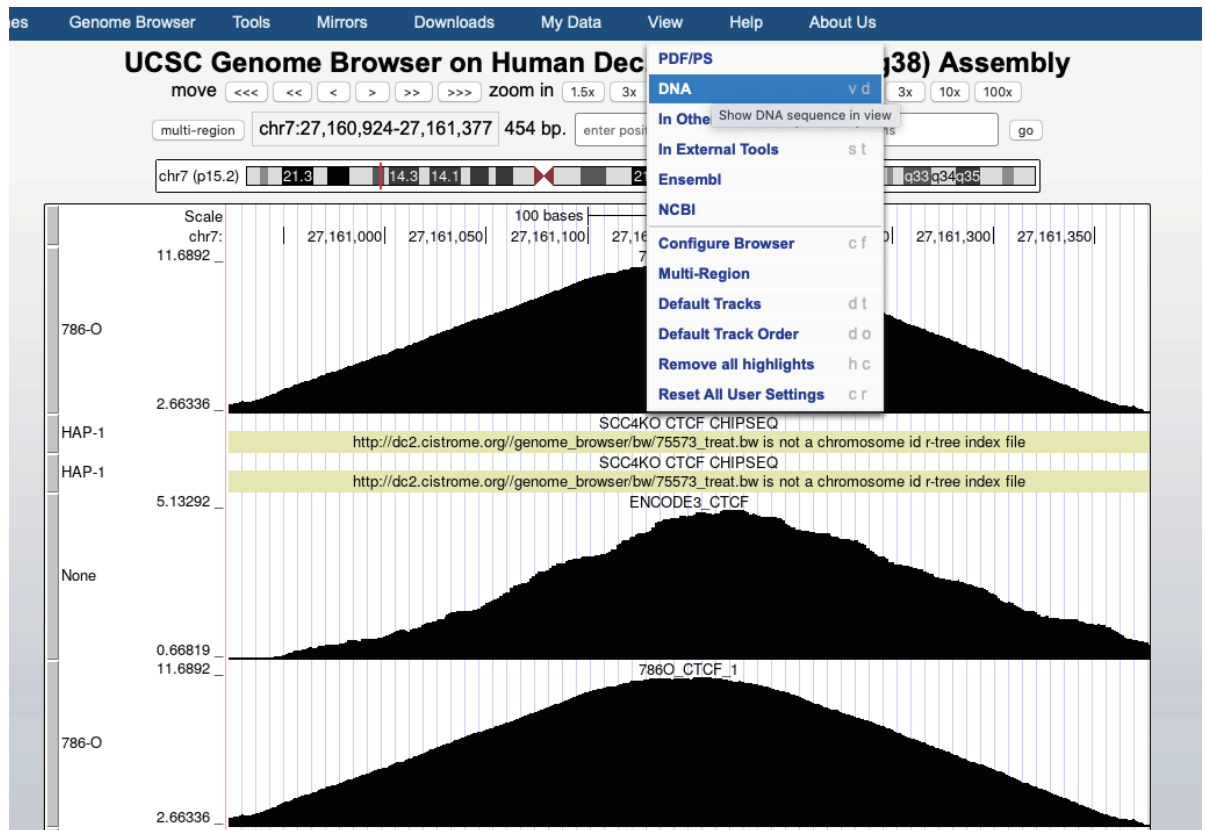
Page 1 of 48



选择在三组数据中都有peak的区域，Zoom In；



在有peak富集的区域选择DNA序列用来设计阳性对照的引物。对于你感兴趣的结合位点，可以先定位到基因，再根据ChIP-Seq的数据选择有peak富集的区域。



Genomes Genome Browser Tools Mirrors Downloads My Data Projects Help About Us

Get DNA in Window (hg38/Human)

Get DNA for

Position

Note: This page retrieves genomic DNA for a single region. If you would prefer to get DNA for many items in a particular track, or get DNA with formatting options based on gene structure (introns, exons, UTRs, etc.), try using the [Table Browser](#) with the "sequence" output format. You can also use the [REST API](#) with the `/getData/sequence` endpoint function to extract sequence data with coordinates.

Sequence Retrieval Region Options:

Add extra bases upstream (5') and extra downstream (3')

Note: if a feature is close to the beginning or end of a chromosome and upstream/downstream bases are added, they may be truncated in order to avoid extending past the edge of the chromosome.

Sequence Formatting Options:

All upper case.
 All lower case.
 Mask repeats: to lower case to N
 Reverse complement (get '-' strand sequence)

Note: The "Mask repeats" option applies only to "get DNA", not to "extended case/color options".

```
>hg38_dna range=chr7:27160924-27161377 5'pad=0 3'pad=0 strand=+ repeatMasking=none
GCGGTGAGGGTCGGGCAAGCCCCGCCGATTCCTTGTTTCCCAGCGAGGC
TTC TAGCCAGGCTTGAGCAGCCAGAAAATATAGGGCGGCTGTCACTAA
AATCTGGGGTCCCATTCCAGAAAGGCTCGTGTCAAGTCGACATCTTAGG
AAC T T C A C A A G G G T C G C G G A G G C G G G A G A T G G C G G C G C G G A A G C C T C T T G
C A T G G A G C C A C A C T G C C A T C T G C T G G C C G C C G T T T G G T A C T G C A G C C T C A
G C T A C C T C C G C C G C C T G A G C T T T G G G A G C C G C C G C T A G C C C A C C G C A C
C C C A C T C C C A A A C G A G G G G C G T G G G C C T A G G T C C C G G G A G T C T G C G T G G
A G C C C G G A A T C T A C T G C A G A G G A G G C A A T G C C A A T A A A A G A G G T G T T T C C
G C A G C C G C T T T A T C G G C G G C A G A C A G A C A A A T G A A C A A A T G A A A G G G C T
T T G G
```

获得DNA序列了，最后就可以利用Primer 3等软件进行qPCR引物的设计，用Blast检验引物特异性。

对于阴性对照的引物，可按照同样的方法，选择没有Peak富集的区域进行设计。

引物设计Tips

1) TF结合的区域通常是启动子，UTR这些A/T比例比较高的区域，因而如果设计出来的引物 T_m 值略低，也是正常的，只要可以保证引物的特异性，不必强求退火温度比 T_m 低5度。

2) qPCR的产物长度一般不要过长，80-150bp就可以，因为在ChIP实验中染色质被片段化，你的PCR扩增的片段越长，这段DNA被打断的可能性就越大，丢失的信息也就越多。

3) 在使用珍贵的ChIP样品前，建议先用genomic DNA做个qPCR来检验引物的效率和特异性。

如果您缺乏相关的ChIP-Seq数据作为参考，仍然有一些小的技巧可以帮助您设计引物。

根据已有的数据判断可能结合的位置，如组蛋白修饰H3K4me3通常在转录起始位点(TSS)附近，引物设计通常选TSS上游500-1000bp和TSS下游500bp。

对于其它蛋白，它是否有特定的DNA结合序列，如果是的话，检验有该序列的区域。对于TF，以TSS附近的DNA序列设计引物是一个很好的着手点，此外，可以看一下启动子区域是否有其它顺式调控元件或已知的其它蛋白结合位点，你关注的蛋白有可能会和其它蛋白在该位点上形成蛋白复合体。建议多设计几个位点的引物。

附录二：ChIP超声建议

获得合适的染色质片段，是ChIP实验成功的第一步。目前大多数方法中推荐使用超声破碎仪进行染色质片段化处理，它可以产生随机片段，免去使用酶切反应片段化过程中可能产生某些染色质片段富集引入偏差的疑虑。

超声前的样本准备

一般情况下，细胞量不少于 10^6 cells，组织样品量在20~30 mg。ChIP富集的DNA片段少，常由起始样本量低及后续反应溶液对样本的过度稀释所造成。

其次，在交联反应过程中，通常使用1%的甲醛固定细胞10分钟左右。（过长的交联反应时间会使细胞形成大的交联聚合物，后续难以超声破碎。）

如果使用的细胞非常难破碎（如淋巴细胞），可将交联反应时间降至5分钟。如果样品需要冷冻，先进行交联反应再冷冻处理。

超声仪参数的设置

下表列出了超声优化的建议。这些参数来自右侧列中引用出版物。此处只是关于超声条件的建议，针对具体情况需进行优化。

超声仪	固定条件	超声条件	参考文献 (PMIDs)
Active Motif PIXUL™ Multi-Sample Sonicator	甲醛甲醇溶液, 甲醛水溶液	Pulse: 50 2MHz cycles/pulse PRF: 1 kHz Process Time: 36 min Burst Rate: 20 Hz	30927002
Active Motif EpiShear™ Probe Sonicator	甲醛甲醇溶液	Amplitude: 25% Pulse: 30 seconds ON, 30 seconds OFF Cycles: 20	27460500 28455377
Covaris® Focused-Ultra-sonicator Models: M220, E220, S2, S220	甲醇水溶液	Shearing Buffer: Buffer D3 Peak Power: 75 Watts Duty Factor: 10.0 Cycles/Burst: 200 Time: 600 seconds	28399410 24466341 29093577 28729413
Diagenode Bioruptor® Models: Pico, Plus, UCD-200	甲醛甲醇溶液, 甲醛水溶液	High power Pulse: 30 seconds ON, 30 Seconds OFF Cycles: 7-12	

改善超声效果的Tips

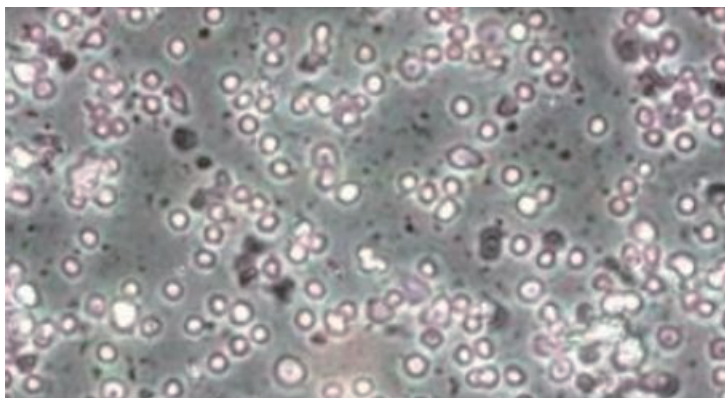
1) 使用较小体积的样品溶液和V-形底而非圆底管进行超声处理有助于提高染色质片段化的效率。若您使用非接触式超声仪，相比常用的聚丙烯材质的EP管，聚苯乙烯材质的EP管超声能量更易穿透，超声破碎效果更好，如Active Motif的Polystyrene Sonication Tubes。

2) 超声时探头要接近管底但不要碰触到管底和管壁。

3) 超声前确保您的样品里没有气泡。这一点很重要，因为泡沫或样品乳化会阻碍DNA断裂，使染色质片段化不完全。可以通过先使用小功率超声再逐渐增加功率的方法来避免泡沫的产生。如样品溶液已经起泡沫/乳化，可先停止超声，4℃下8000rpm离心4分钟，从而除去气泡。

4) 超声过程中冰浴间歇的步骤很重要。因为超声脉冲会引起微环境的急剧升温，进而引起蛋白质的破坏/降解，影响后续的免疫沉淀反应。

5) 如果您的细胞直接超声处理效果较差，可以先使用细胞匀浆器辅助超声破碎。我们建议使用玻璃管与柱塞间距在0.013-0.064mm的玻璃细胞匀浆器，如Active Motif的玻璃细胞匀浆器（货号40401，规格1mL；和40415，规格15mL）。这一规格的匀浆器是专门设计用于机械破碎细胞膜的，匀浆后细胞核仍保持结构完整。充分的细胞裂解处理有助于获得更多的染色质片段，匀浆效果可通过显微镜下检测细胞裂解状态。



匀浆器处理后显微镜下检测细胞裂解

匀浆器研磨几次后，细胞彼此分离形成单细胞溶液，但细胞核还未释放出来。

如果观察到的是如左图的情况，需要继续匀浆至细胞核分离出来。过度固定的细胞即使继续匀浆仍无法破裂，这种情况下要减少固定的时间。

附录三：富集度的计算

ChIP反应的起始样品叫做Input，比如用20 μg染色质去做一个ChIP，那Input就是20 μg。

在做ChIP之前我们一般会取出一定比例的Input作为对照，我们通常称之为%的Input。如我们一共有41 μg的染色质，准备用20 μg做一个H3K4me3的ChIP，同时再用20 μg做一个IgG的对照ChIP。最后用剩余的1 μg染色质做对照，这1 μg的染色质相当于一个ChIP反应所用染色质（20 μg）的5%，我们称之为5%的Input。那么就说我们用了5%的Input（1 μg/ 20 μg=0.5%）作为对照。

ChIP结束之后，将5% Input DNA，H3K4me3 ChIP DNA以及IgG ChIP DNA纯化之后都溶解到等体积的水、10 mM Tris pH 8.0或TE buffer中。分别设计目的区域A，阴性区域B和阳性区域C的引物。引物扩增片段大小以小于超声后DNA大小为宜，一般设计70-200bp，因为扩增片段太大，上下游引物结合的模板有可能不是位于同一个DNA片段上，导致扩增效率较低，甚至会影响真实富集度。准备好之后分别用5% Input，H3K4me3 ChIP，IgG ChIP的DNA作为模板，qPCR分别扩增A，B，C三个区域。H3K4me3在任何一个区域的富集都都可以用这个公式计算： $5\% \times 2^{[CT\text{value}(\text{Input-H3K4me3})]}$ ，同样IgG的富集度的计算公式是： $5\% \times 2^{[CT\text{value}(\text{Input-IgG})]}$ 。

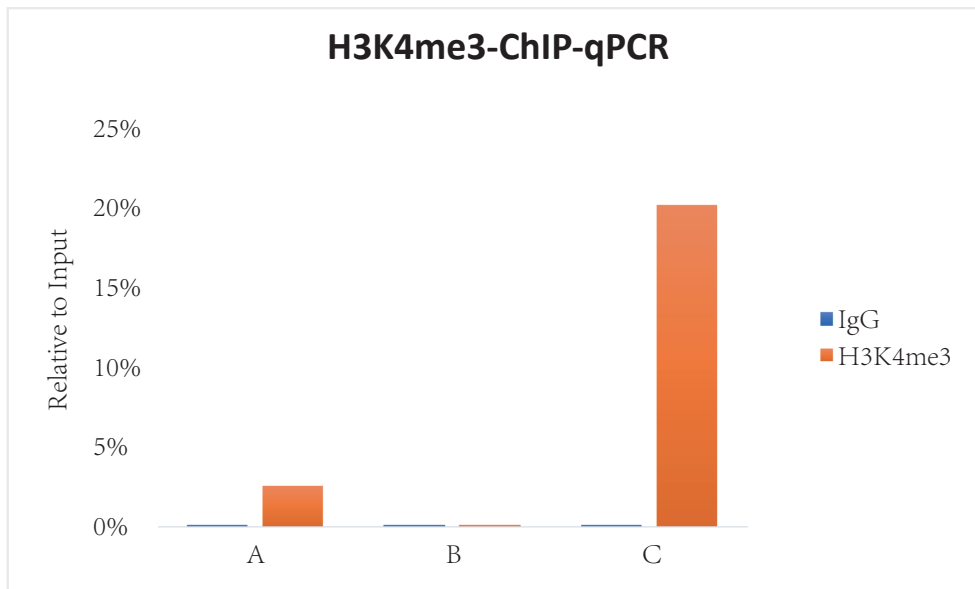
如下表所示：

CT value	5% Input	IgG	H3K4me3
A (Target region)	26	32	27
B (Negative region)	25	32	33
C (Positive region)	25	31	23

根据上面的公式推导出富集度如下表所示：

Enrichment	IgG	H3K4me3
A (Target region)	$5\% \times 2^{(26-32)} \approx 0.08\%$	$5\% \times 2^{(26-27)} \approx 2.5\%$
B (Negative region)	$5\% \times 2^{(25-32)} \approx 0.04\%$	$5\% \times 2^{(25-33)} \approx 0.02\%$
C (Positive region)	$5\% \times 2^{(25-31)} \approx 0.08\%$	$5\% \times 2^{(25-23)} = 20\%$

通过计算富集度，我们就可以清楚地知道目的蛋白在感兴趣的DNA区域的结合强弱。



确定ChIP成功之后就可以将样品建库，测序用于全基因分析。

登录ActiveMotif.com 查看更多资源



表观遗传学博客



表观遗传学电子书



科学海报



表观遗传学网络研讨会

Active Motif (中国)

Mobile: +86 185 2136 2870

Direct: +86 21 2092 6090

Add: 上海市静安区万航渡路889广场1602B

techchina@activemotif.com

www.activemotif.com

关注我们



表观遗传研究专家

中国区独家代理商

Proteintech 中国公司

Direct: +86 27 8753 1629

Add: 湖北省武汉市东湖新技术开发区高新大道666号D3-3

proteintech-cn@ptglab.com

www.ptgcn.com

