**ChIP实验sop**

**所需要的试剂**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 所需试剂 | 英文名称 | 品牌 | 货号 | 价格 | 备注 |
| 甲醛 | formaldehyde | Sigma | F8775-25ML | 299.52 | 交联作用 |
| 甘氨酸 | glycine | Sigma | G8898-500G | 623.61 | electrophoresis grade |
| PBS | PBS |  | P5368-10PAK | 673.92 |  |
| 抑肽酶 | aprotinin |  |  |  |  |
| 亮抑酶肽 | leupeptin |  | L2884-.5MG | 450.45 |  |
|  | PMSF |  | 000000010837091001 | 1111.5 | 一种蛋白酶抑制剂 |
|  | PIPES |  | 无信息 |  | 一种缓冲液 |
|  | KCl | Sigma | P9333-500G | 1,003.86 |  |
|  | Igepal |  |  |  |  |
|  | Tris–HCl | invitrogen | AM9856 |  |  |
|  | EDTA | Sigma | EDS-100G | 262.08 |  |
|  | SDS | Sigma | 74255-250G | 513 |  |
|  | NaHCO3 | Sigma | 792519-500G | 505.4 |  |
|  | DNase-free RNase A | Fermentas | EN0531 | 418.00 | 10mg/ml |
|  | 纯化试剂盒 | Qiagen |  |  | 可以用其他的代替 |
|  | Qubit | Invitrogen |  |  | 无需采购 |
|  | 琼脂糖 |  |  |  | 无需采购 |
|  | ChIP grade antibodies | Active-motif |  |  | 根据需要选择合适的抗体 |
|  | Magnetic protein G beads | Cell Signaling Technology | #9006 |  | 他家也卖抗体 |
|  | LiCl | Sigma | 746460-100G | 728.91 |  |
|  | Deoxycholic acid | Sigma | D2510-10G | 146.25 |  |
|  | NaCl | Sigma | 746398-500G | 465.66 |  |
|  | SYBR-Green qPCR mix |  |  |  |  |
|  | 引物设计 |  |  |  |  |

**所需要仪器**

固定好的细胞送来我们做后面的实验：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 仪器名称 | 品牌 | 货号 | 备注 |
| a glass dounce homogenizer | 有国产和进口 |  |  |
| 4度离心机 |  |  | 可以离心15ml离心管，需要进行购买 |
| 超声波破碎仪 |  |  | 不需要购买 |
| 4度恒温混匀仪 |  |  | 可以进行适当改装 |
| 磁力架 |  |  |  |
| 金属浴/水浴锅 |  |  |  |
| 电泳仪 |  |  |  |
| 荧光定量PCR仪 |  |  |  |

**所需配置试剂**

1，交联所用到的试剂

1. 交联试剂：37%的甲醛（37% w/w）
2. 终止反应试剂：甘氨酸（电泳级别electrophoresis grade）
3. Wash solution：phosphate-buffered saline即PBS

2，Chromatin Preparation Reagents

1. Protease inhibitor stock solutions（可以分成小包装保存于-20°C）：10 mg/ml aprotinin (in water)，10 mg/ml leupeptin (in water), 100 mM PMSF (in isopropanol，保存于异丙醇)
2. 细胞裂解液（室温保存）：5mM PIPES pH 8，85 mM KCl。Igepal是现用现加，终浓度1%（10 μl/ml），37°C温浴混匀后冰上放置，冷却后加入蛋白酶抑制剂：PMSF (10 μl/ml )， aprotinin (1 μl/ml)和 leupeptin (1 μl/ml)
3. 核裂解液（室温保存）：50 mM Tris–HCl pH 8，10 mM EDTA和1% (w/v) SDS，用之前将裂解液放在冰上，但是一定要避免SDS的析出。用之前加入蛋白酶抑制剂：PMSF (10 μl/ml f.c.), aprotinin (1μl/ml f.c.), and leupeptin (1 μl/ml)

3，Chromatin Check Reagents

1. Elution buffer（常温）：50 mM NaHCO3， 1% (w/v) SDS
2. DNase-free RNase A(Fermentas; 10 mg/ml)
3. QIAquick PCR purification kit (QIAGEN)
4. NanoDrop或是qubit

4，Chromatin Immunoprecipitation Reagents

（1） ChIP grade antibodies（主要列举了6种组蛋白修饰的）

a. H3K4me3: Anti-Tri-Methyl-Histone H3 (Lys4) (C42D8) rabbit monoclonal antibody (CST #9751S).

b. H3K9ac: Anti-acetyl-Histone H3 (Lys9) rabbit antibody (Millipore #07-352).

c. H3K27me3: Anti-Tri-Methyl-Histone H3 (Lys27) (C36B11) rabbit monoclonal antibody (CST #9733S).

d. H3K9me3: Anti-Tri-Methyl-Histone H3 (Lys9) rabbit antibody (CST #9754S).

e. H3K36me3: Anti-Tri-Methyl-Histone H3 (Lys36) rabbit antibody (CST #9763S).

f. H3K4me1: Anti-Mono-Methyl-Histone H3 (Lys4) rabbit antibody (Diagenode #pAb-037-050).

（2） Protease inhibitor stock solutions（-20°C保存）：10 mg/ml aprotinin (in water), 10 mg/ml leupeptin (in water), 100 mM PMSF (in sopropanol)

（3） IP dilution buffer（4°C保存）：50 mM Tris–HCl pH 7.4，150 mM NaCl，1% (v/v)

igepal，0.25% (w/v) deoxycholic acid, 1 mM EDTA pH 8。使用之前加入蛋白酶抑制剂：PMSF (10 μl/ml f.c.), aprotinin (1 μl/ml f.c.), and leupeptin (1 μl/ml f.c.)

5，Capture the Antibody/Chromatin Complexes and to Reverse Crosslinks

1. Magnetic protein G beads（Cell Signaling Technology），magnetic rack（磁力架），不要用用外源DNA修饰的beads，如herring sperm or salmon sperm DNA，导致外源的DNA也会进行测序，数据质量会下降。protein G beads对于很多抗体有很好的亲和性，但是如果有需要的话也可以用protein A beads
2. IP wash buffer 1（4°C保存）：与IP dilution buffer的成分一致，但是不用加蛋白酶抑制剂
3. IP wash buffer 2（室温保存）：100 mM Tris–HCl pH 9, 500 mM LiCl, 1% (v/v) igepal, 1% (w/v) deoxycholic acid
4. IP wash buffer 3（室温保存）：100 mM Tris–HCl pH 9, 500 mM LiCl, 150 mM NaCl, 1% (v/v) igepal, 1% (w/v) deoxycholic acid
5. Elution buffer（室温保存）：50 mM NaHCO3, 1% (w/v) SDS
6. 5 M NaCl

6，DNA 纯化

1. DNase-free RNase A (Fermentas; 10 mg/ml).
2. QIAquick PCR purification kit (QIAGEN)

7，ChIP Confirmation

1. SYBR-Green qPCR mix, such as SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix (SIGMA).
2. Positive and negative control primer sets（用相应的软件进行设计），片段大小90-150bp。如果是有条件的话可以对ip，input分别设置2对引物。在进行验证之前必须需要先知道引物是可以进行作用的

**实验流程：**

1. 准备细胞
2. 细胞的生长状态保证良好，并且密度不能太大。细胞或是组织在收集后可以进行冷冻；或是在交联之后进行冷冻。对细胞数目的要求和抗体，以及感兴趣的组蛋白的丰度有一定的关系。一般来说每个抗体一般需要100,000-500,000个细胞。在通风橱内，在PBS里面加入1%的甲醛，立即放入加入到冷冻的细胞里面，用枪头进行重悬。对于新鲜培养的细胞，直接加入37%的甲醛，终浓度在1%即可
3. 室温孵育10min，对于先前冷冻的细胞要在密闭的空间中进行震荡孵育，对于培养的细胞在培养皿中进行震荡孵育（交联时间不要过长，否则细胞进行聚集，影响后续的打断）
4. 终止交联：加入甘氨酸，终浓度为0.125M，室温下继续进行震荡孵育5min
5. 对于悬浮细胞：细胞4°C进行离心430 rcf for 5 min，去掉溶液，用冷的1X PBS进行清洗2遍，430 rcf for 5 min at 4°C，去掉洗液。

对于贴壁的细胞，倒掉培养基，用1X PBS进行清洗2次后，去除洗液。采用细胞刮棒，将细胞从培养皿中转移到15ml的离心管中，这一步要在冰上进行操作。430 rcf for 5 min at 4°C，离心后在吸上清的时候注意不要吸到细胞。注意：含有甲醛的培养基应该被当做有毒物质进行处理

1. 交联的细胞应当赶紧进入下一步实验，或是用液氮冷冻后保存于-80°C
2. Preparation of Chromatin（这是我们开始的步骤）
3. 若用的是液氮的冻存的细胞的话，使其在冰上进行融化，要保证一直在冰上放置。准备细胞裂解液（1ml细胞裂解液对应107个细胞）：加入Igepal（1ul/ML，在37度进行溶解，在冰上进行冷却），再加入protease inhibitors（[PMSF (10 μl/ml), aprotinin (1 μl/ml), and leupeptin (1 μl/ml)]）。用新鲜配置的冷的裂解液将细胞进行重悬（用枪进行重悬）。保证细胞裂解液是足够，这样的话可以保证没有细胞块，在冰上孵育15min。
4. 用匀浆器将细胞搅拌均匀（a glass dounce homogenizer），保证细胞破碎，释放细胞核，在冰上操作20下。若是细胞数目小于100万（106），此步骤可以进行忽略
5. 430 rcf for 5 min at 4°C
6. 丢弃上清，用加了蛋白酶抑制剂的裂解液进行重悬。注意细胞裂解液不要加太多，这样的话会稀释Chromatin。106次方细胞20ul，在冰上孵育30min
7. 可选步骤：对细胞进行冻存的话可以有效的破碎细胞，若是步骤2被忽略的话，这一步是很重要的。孵育完30min后，用液氮进行冷冻，在室温下进行融化，一旦融化后抓紧转移到冰上，不要让样本在室温下继续升温，进行下步的超声破碎
8. 超声破碎：在低温的条件下对染色质进行超声破碎，片段大小200-500bp。较大的片段数据会不好，可能或导致后续的chip实验失败。因此在进行打断之前，对不同细胞的打断条件需进行优化，选择优化好的条件进行打断
9. 用移液器将打断的体系进行转移，10,000 rcf for 10 min at 4°C。吸取上清时注意不要吸到下层碎片。在对打断的DNA进行质控时（定量以及检测打断的效果，一定要保证Chromatin放在冰上。质控结果合格后就可以开展下面的chip实验了
10. 检测打断的片段大小和浓度
11. 检测打断大小用到的细胞数量：100,000 - 200,000
12. 加入chip elution buffer，总体积为100ul，加入12ul 5M Nacl，终浓度为0.54 M. 沸水浴20min进行解交联
13. 样本降温后，加入1 μl DNase-free RNase (10 mg/ml), 37度20min。这一步比较重要，重要原因是：RNA会对片段大小的检测有影响
14. 用DNA纯化试剂盒纯化DNA，用25ul进行洗脱，对DNA浓度进行测定
15. 1.2%的胶检测打断条带的大小，若是条带较大，需要进行加打，加打后也需要进行检测
16. Chromatin Immunoprecipitation

Preparation of Chromatin和Chromatin Immunoprecipitation最好在同一天进行

1. 根据Chromatin的体积，根据需要进行划分。Chip实验需要的染色质的量和组蛋白的修饰是有一定的关系的，如：H3K4me3，一般用1ug chromatin，如：H3K9me3 or H3K36me3，一般用5ug chromatin。
2. 可选步骤：IgG negative control是可以进行开展的，即beads only control。
3. 500ng的染色质作为input，先将其放在-20度，等后续一起进行解交联。
4. 用冷的含有蛋白酶抑制剂的Ip dilution buffer将chromatin进行5倍稀释
5. 加入特定的antibody，抗体的量一般是与经验相关的，一般用1-5ug（每个chip 实验）
6. 4度下旋转孵育8-16H

5, Capture of Antibody/Chromatin Complexes and Reversal of Crosslinks

备注：第1步在4度进行，其余的在室温下进行操作

1. 在每个样本中加入15 ul 的protein G beads，4度振荡孵育2h
2. 在室温下，将beads放在磁力架上静置1min，去上清
3. 用IP dilution buffer清洗2次，有效的清洗有利于降低背景效应，避免样本之间的交叉感染。不要吸到磁珠
4. IP wash buffer 2清洗2次，去掉上清
5. 用IP wash buffer 3清洗1次，去掉上清
6. 100ul的elution buffer，室温下振荡30min
7. 在磁力架上静置，将上清吸到新的离心管中
8. 每100ul的elution buffer中加入12 μl 5 M NaCl，终浓度为0.54M
9. 解冻先前的Input样本，在input中加入80ul的elution buffer，总体积为100ul。加入12ul 5M NaCl
10. 67度水浴过夜进行解交联（时间有点长，上边的流程都是一样的）
11. DNA纯化
12. 上述体系冷却到室温，加入1ul RNaseA，37度孵育20min
13. 用纯化试剂盒进行纯化，40ul elution buffer进行洗脱
14. 通过qPCR进行定量

**Notes：**

1. 后续验证设计的引物的长度90-150bp，若是可以的话positive和negative设计至少2对引物，引物测试可用后验证chip的样本
2. Chromatin可以通过超声进行打断，也可以进行酶切，两者均是可以的，此实验方法用的是超声，超声的条件必须经过优化
3. prepare chromatin和chip最好在同一天进行，必要的话可以将prepare chromatin放在液氮冷冻或是-80，后续再进行使用
4. 100万的细胞一般有5-10ug的chromatin。一般刚培养的细胞的产量会比保存的细胞产生的chromatin量多一些。若是总量小于1ug的话对实验会有很大的影响
5. Chip实验最大的限制是抗体，虽然抗体公司已经建议了抗体的最佳使用量和验证了抗体的性能，但是在开展实验之前抗体还是需要进行测试的