

## Chromosome Conformation Capture (3C)

### 一、3C 模板的制作

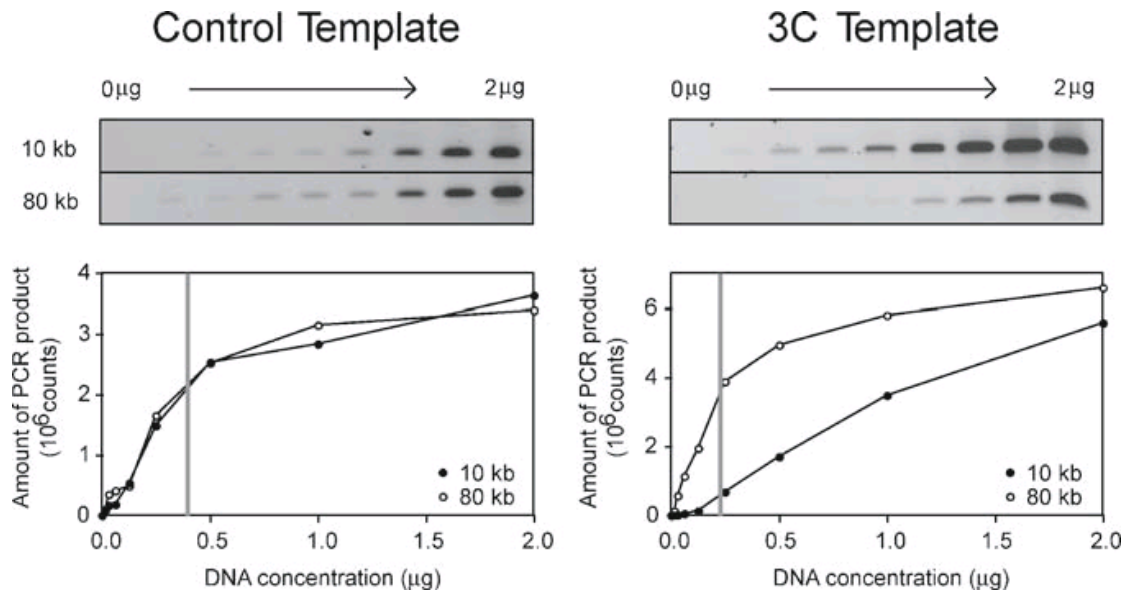
1. 10 cm 培养皿的细胞密度 80-90%，真空泵吸干培养基，用 3 mL 含 1% 甲醛的 PBS 溶液（现配）室温固定 10 min，用真空泵吸干，加入 3 mL 浓度为 0.125 M 的甘氨酸 PBS 溶液，平衡 5 min。
2. 收集细胞并计数，用  $5 \times 10^6$  个细胞进行下面的实验。
3. 用 PBS 洗细胞，加入含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液，冰上放置 15min，期间不断震荡，1000g 离心收集细胞核，用内切酶 buffer 洗一次。
4. 加入 297 $\mu$ L 内切酶 buffer，3 $\mu$ L 10% SDS（终浓度为 0.1%），65 $^{\circ}$ C 10 min，加入 16 $\mu$ L 20% TritonX-100（终浓度为 1%），混匀 37 $^{\circ}$ C 平衡 1h，补充内切酶 Buffer 3 $\mu$ L，BSA 3.2 $\mu$ L。
5. 加入 500 单位的内切酶，如 MseI（内切酶的量应小于总体积的 10%，否则会产生星号活性；必要时，可用内切酶的高浓度包装）混匀 37 $^{\circ}$ C 酶切过夜。
6. 加入 10% SDS 30  $\mu$ L（终浓度 1%）65 $^{\circ}$ C 灭活 20 min。加入 350  $\mu$ L 20% Triton X-100（终浓度为 1%），加水至 6 mL，37 $^{\circ}$ C 平衡 1h。
7. 加入 Ligase Buffer 700 $\mu$ L，T4 Ligase 20 $\mu$ L，BSA 70 $\mu$ L，加水至 7 mL。
8. 16 $^{\circ}$ C 过夜连接，室温放置 1h（此步可补平连未完全连接的缺口）。
9. 加入 4M NaCl 350  $\mu$ L（终浓度为 0.2M），0.5M EDTA 14.5  $\mu$ L（终浓度为 1mM），10% SDS 200  $\mu$ L，20mg/mL 蛋白酶 K 20  $\mu$ L（终浓度为 50ug/mL），65 $^{\circ}$ C 过夜。
10. 苯酚 / 氯仿抽提（室温离心，4 $^{\circ}$ C 离心会使 SDS 析出并产生胶状沉淀），异丙醇沉淀。
11. 取 100 ng DNA 为模板做 PCR 来检测染色质空间构象。

### 二、3C 对照模板的制作

12. 首先要获得含有目标基因组片段的 BAC DNA。
13. 在 200  $\mu$ L 体系中加入 20  $\mu$ g BAC DNA 用 15  $\mu$ L MseI 酶切过夜。
14. 苯酚 / 氯仿抽提（使内切酶灭活，此时可在 4 $^{\circ}$ C 离心），乙醇沉淀收集 DNA。

15. 沉淀的 DNA 用 170  $\mu\text{L}$  水溶解，并加入 20  $\mu\text{L}$  10 $\times$ Ligation Buffer, 8  $\mu\text{L}$  T4 DNA Ligase, 2  $\mu\text{L}$  BSA, 16 $^{\circ}\text{C}$  过夜连接。
16. 苯酚/氯仿抽提（此时可在 4 $^{\circ}\text{C}$  离心），乙醇沉淀。
17. 用水溶解后取 100ng 做 PCR 定量。

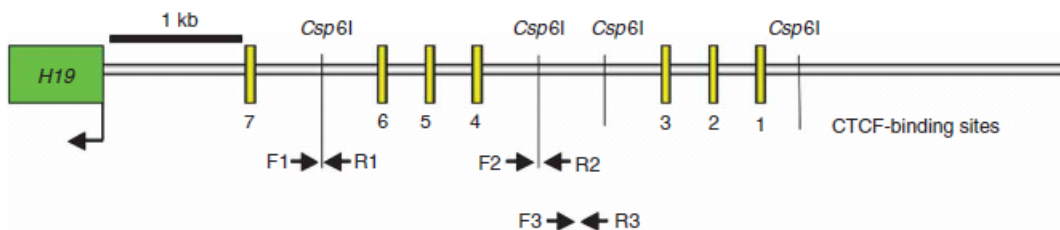
### 三、3C PCR



3C PCR 的结果应如上图所示，对于在基因组中相距 10kb 和 80kb 的两个片段，用对照模板扩增应没有明显区别，而用 3C 模板扩增则 10kb 的片段应扩增出更亮的条带。

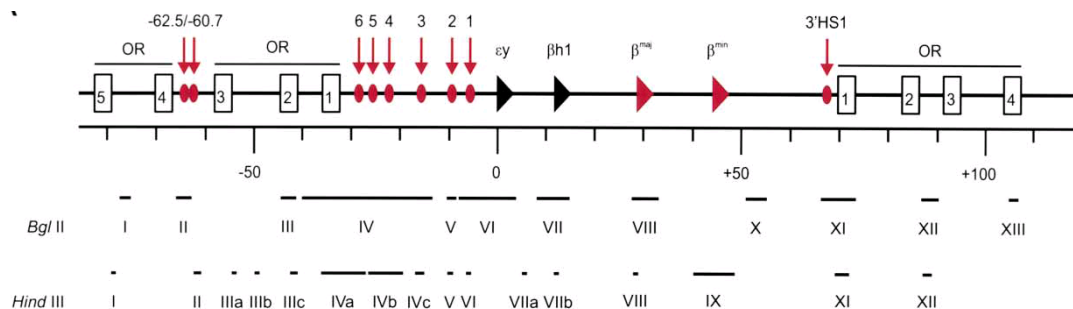
### 四、3C 过程中应先检测的条件

酶切效率的验证：开始 3C 实验时应优化实验体系，使酶切效率高于 70%。  
酶切效率检测方法：

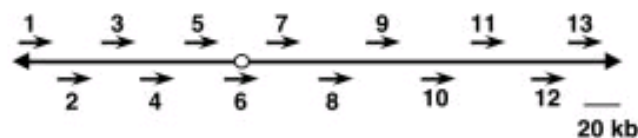


如上图所示：可在酶切位点（F2，R2）和不在酶切位点（F3，R3）（产物不包含酶切位点）分别设计引物，以酶切产物和基因组为模板做 real-time PCR 验证酶切效率。

## 五、3C 引物设计



如图所示，如要研究基因组中某个区域的空间构象，首先应把这个区域的所有酶切位点都找到，然后对着酶切位点设计引物，如下图，并且引物的方向做好都一致，这样可以确保扩增出来的条带为目标片段。



具体来讲如要对下面这一片段设计引物

```

gatttatttattttatgtatgtgagtactctgttgctgtcttcagacacaccaggagagggcatcatgacccctttacagatggtcg
tgagccaccatgtgggtgctgggattgaactcaggacctctggaagagcagtcagtgctctgaacctctgagccatttctcc
aggccTGAGAttaaTTTTTTACCAGCATTCACCCTCCATCCCTCACTCCGATGCC
AGCACAGGCAGCCTCTAGGAGGCCTTACACTGGGCACTCTCCTTCCCTGC
CTTCCCCGGTGTCTGCTGGCCCTATGGACTCTAGTTCCTGCCCTCGAGACTGC
TACCATAACCTCCATGAGCACCTCACTACATCAGGCCCTTGGCCATCTCTG
CACTCGCACACCTTCTTGCCAAGAATATGAAGGCTGGGTCTTTGAGGAG
GCCTCCTAGGCCAGTCTACACAAATGCGTACCCTCCTCTCCTGTCTCTTTT
CCCCAGGCTGGCCCGTTTCCAATCTCATATGGTTGCTGACTTGGTTTGCAC
ATCTGCATGTCTGTTTTTCTGACTCACAACAGTGAGTGAGGCCACCCTGAC
CCTGACCCTGTCTGTCTGTCCAGCTGTTTCCCCAGCACTGGGGACTTGAG
AAGTTCTAAGGGTTAGGGTGCTTATCTACTTGTGTTTGGTTTGTGTTTGTCT
TTCTTTTTTCTGttttgtctttgagatagcatctctccttgtagccaagccttgcctcaaacctctcagtcctctcaagag
    
```



GTTTTTCTGACTCACAAACAGTGAGTGAGGCCACCCTGACCCTGACCCTGTC  
 TGTCCGTCCAGCTGTTTCCCAGCACTGGGGACTTGAGAAGTTCTAAGGG  
 TTAGGGTGCTTATCTACTTGTGTTTGGTTTTGTGTTTTGTCCTTTCTTTTCTGttt  
 tgcctttgagatagcatctctcctttag**ccaagccttgctcaaacctctcagctctca**agagcctgagcctcctaaccactg  
 ggactgcgggtgtgtacccccaccagATAGGCGC MseI  
 tttttattttttttttGAGGTATGAAAAAGAGTATGCTGTCAACATGAAGATATAAG  
 GTGGGGGAAGCAGTTAGTGTATTCTTCATAGATAGTGTGACAGTGGCAGA  
 TGGCATCACACTTGGCAGTGACCTTAGGTTGAGGAGCTTTAGAGGAAACA  
 CAAGTGCCTCGATTCCCAAGTGTCTGCTCGGAGACCTCAGTCTCAGCATCC  
 CATAGAGCTTATCAAAAGGGGGCTGCGTGTGAG**CCTGACAGCACTGTCTT**  
**CCTAGACACCAGCT**GGTGGTAAACAACCCTCCCCGGCCTGTAAGACATGG  
 AGACATTGTACAGCTCGTTCACGGCATGACCACCCGCCTCC

MseI

CACGTGAGTGCCCCAGTGCTTGTCTGTGTCAGGGTCTCCTTCACTCTGTCTA  
 CATCCCCTCAGCCTGTTTCCGTCATCCTGACTTCTGCCTCCACCTCACTCC  
 CGTGAGAATACACAGTGGGCTTCATGGCTTTTCTGCCCACAGCCCTCTCTC  
 TAGTGACCCTCTCAGCTCTCCTGAGGCTCCTAGTGACCCTGACTAGTGTCA  
 CCCCATCACTTGGCCTCCCTGGTAGCCCTGAAGTAAGCAGCACAGCACCT  
 CAGGGTTTCCCCACTCTCTTACTGCTGGGGTACCTAAGGTCACCTTACCA  
 GAAACCTGCCTGTACTGTCCCTCCTATAGATCTTATTCTGACACTCACTCT  
 GTCTGGCAGCCATCATCCACTGCTCACTGCTGGGCCTCTTCGGGCGCCTG  
 GTGCATCCTGAGATGAAGTGAGTCCTGCCTGAGTAGCCTGGAGGTGACAG  
 GCTGCTTGTGAACACTGAGGCTGACCCACACAGAGTAGCCTGCTGTCTCA  
 GCGTGAGACCACTGTGCCATCTCGCCAGAGACAACAGTACTATACTGA  
 TTTCCGAGTTCTGCCAGACCAGTGATACACTGGGGCCAGTTCTTAGACTC  
 AACTTCCAGTTCCCTGGAACAGACATTCTATTCTCAGAGATTGCTcacctgtc  
 caaagagtgagtacacccatccaattggttgacatcaattctggac**acacacaatgaagaccctccctcacag**atacacca  
 acaaggcgggtgatctgggcagtcctgcagttgagttggttctcagatgacttaggctgtgtcatggtgacca

MseI

aGCCTGCCTTGGGGTGGCCACATCCCGGATACATAGCCTCTGTGGGAGCT  
 GCATTTGTGGCCAGCTTCCCTAGCCTTGGCAGGCAGAGCAGGCTTGGTTTC  
 CAAAGGCACTGTTTTTCCCTTAGTGACACTCTAAGGAATAGCTCTGCTCTG  
 CTCTTGCAGGCACGATGTCGCAGCCCCAC

对于上边这个片段所设计的 3C 引物为：

**ggaagagcagtcagtgctctgaacctetgagcc**

**ccaagccttgctcaaacctctcagctctca**

**CCTGACAGCACTGTCTTCCTAGACACCAGCT**

**Acacacaatgaagaccctccctcacag**

所用试剂：

10%SDS, 37% 甲醛, PBS 溶液, 1.25M 甘氨酸溶液 (10×甘氨酸溶液), 10% Triton X-100

细胞裂解液: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM NaCl, 0.2% Nonidet P-40, 平衡酚溶液 (PH8.0),

特异的内切酶 (如MseI), T4 DNA Ligase, 蛋白酶抑制剂 Cocktail