

ChIP protocol

一、细胞固定

1. 准备一盘 150mm 培养皿培养的细胞，生长 80—90% 满。（此细胞量足够做一次 ChIP，本次以 U2OS 细胞为例）除去培养基。
2. 加入新鲜配制的 1% 甲醛 PBS 溶液 5mL 室温固定 10min（不同细胞可能会用不同的固定条件，如果下一步超声无法将 DNA 超到小于 1000bp，应减少甲醛浓度或者降低固定的温度，如 4°C 固定），除去甲醛溶液，加入新鲜配置的 1×甘氨酸（0.125M）PBS 溶液 5mL，室温 5min。
3. 除去甘氨酸溶液，用 PBS 洗一次，将细胞收集到离心管中（冰上操作），4°C，800g 离心细胞 3min（细胞固定后可能会不太容易离心下来，如有必要可加大离心转速）除掉 PBS 溶液。（细胞可在 -80°C 冻存）
4. 加入 1mL 含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液，吹打均匀，放在冰上 15min，每 5min 涡旋一次。
5. 4°C，800g 离心细胞 3min，除去上清，加入 500μL 含有蛋白酶抑制剂的核裂解液。

二、超声

1. 第一次做超声应摸一下超声条件（所有超声应在冰上进行）：将上述核裂解液放入超声仪中，超声仪条件为：30s on，30s off。取 4min、5min、6min、7min 超声产物各 20μl，加入 1μl 蛋白酶 k（20mg/mL），65°C 孵育至少 6h，加入 1μl RNase A，37°C 30min。电泳检测染色质超声片段的大小应在 200—1000bp 之间为最佳。
2. 超声结束后用 4°C，12500g 离心 10min，取上清，用 nanodrop 测定超声液浓度。（此浓度大小与细胞量和加入核裂解液的量有关），此浓度应大于 1μg/μl。（超声液可在 -80°C 保存）

三、免疫沉淀

每次做免疫沉淀至少应该有阴性和阳性对照，即样品对照和 IgG 的对照。

1. 在 1.5mL 离心管中加入 200ul 超声液，400ul ChIP Dilution Buffer，12ul Cocktail，20ul 磁珠（加入之前充分混匀），5ug 抗体，4°C慢摇过夜（用旋转仪最慢速旋转）。
2. 依次用低盐，高盐，TE 缓冲液 500mL 去洗磁珠，每次洗 5min。（整个过程在冰上进行，用不同的缓冲液洗之间应该换管子，洗涤过程中用真空泵彻底吸干管壁上残留的液体。注意最后一次用 TE 洗涤时不能用真空泵，应用枪吸走上清，否则会将磁珠一起吸走）
3. 最后一次洗涤后应测定 TE 缓冲液的浓度，其测定结果应无明显的 DNA 含量。

四、解交联

1. 将 ChiP elution buffer 室温孵育让其中 SDS 完全溶解，在上述磁珠中加入 100ul chip elution buffer，1ul 蛋白酶 k（20mg/mL），充分混匀，65°C过夜。
2. 将管子放入磁力架中，将上清转移至另一 EP 管中，酚氯仿抽提，乙醇沉淀（多少体积无水乙醇沉淀，写清楚），最后用 50ul 水溶解，测浓度，一般不会大于 20ng/ul，否则说明 ChiP 的非特异结合太多。
3. 设计合适的 PCR 引物进行检测。

所用试剂：

Low Salt Wash Buffer（低盐洗脱液）：

0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl, pH 8.1, 150mM NaCl.

High Salt Wash Buffer（高盐洗脱液）：

0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl, pH 8.1, 500mM NaCl.

ChIP Dilution Buffer:

0.01% SDS, 1.1% Triton X- 100, 1.2mM EDTA, 16.7mM Tris-HCl, pH 8.1, 167mM NaCl.

TE buffer:

20mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8

Cell lysis buffer (细胞裂解液):

10mM HEPES, pH7.9, 0.5% IGEPAL-CA630, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl

Nuclear lysis buffer (核裂解液):

50mM Tris, pH 8.1, 10mM EDTA, 0.3% SDS

蛋白酶抑制剂 cocktail

PBS 溶液

特异蛋白的抗体 (ChIP 级别)