****

ChIP实验常见问题解析

****

**ChIP实验常见问题解析**

**1.染色质免疫共沉淀(ChIP)实验中使用超声方法断裂染色质温度不易控制，可能会使蛋白变性，如何进行优化？**

[染色质免疫共沉淀(ChIP)](http://www.zoonbio.com/antibody-service-index-Testing-ChIP.html)实验中超声的优化一般从如下几个方面考虑:

（1）重复已发表文献中的剪切方案时建议进行优化。尤其是当仪器不同于文献中所使用的仪器时。
（2）使用基于探头的超声破碎仪时，探头要适于样品体积。
（3）在任何情况下，剪切参数都应当根据样品体积、细胞密度和细胞类型而优化。
（4）优化应当包括功率设置（超声时间 vs. 间隙时间/休息时间）以及获得长度为200 – 1000 bp的DNA片段所需的剪切循环数，每个优化实验只优化一种参数；
（5）注意时间和功率设置。过度破碎和太高功率设置会损害在免疫沉淀步骤中的表位。降低染色质免疫共沉淀（ChIP）信号。
（6）始终保持裂解液冰冷，间断超声（而非连续），因为超声处理产生热量会使染色质变性。
（7）在超声破碎过程中避免气泡。泡沫会导致蛋白质的表面变性，可能使染色质损失在气泡中。为了避免这种情况，一开始设为较低功率，再逐步提高。
（8）在优化条件时，每个超声破碎循环后通过琼脂糖凝胶电泳分析DNA片段的长度。剪切不足所产生大的不溶复合物可能堵塞琼脂糖凝胶的孔，并延缓电泳过程。通过消化蛋白质、逆转交联、酚:氯仿提取和沉淀来纯化DNA。

**2.染色质免疫共沉淀（ChIP）实验研究转录因子，调控因子结合的DNA和组蛋白结合的DNA操作上最大的区别是什么？**

染色质免疫共沉淀（ChIP）实验中由于组蛋白在染色质中表达相对较高且较稳定，转录调控因子表达水平很低，往往是瞬时表达。所以组蛋白相对研究起来更为容易，一般需要105-106个细胞即可完成一个染色质免疫共沉淀（ChIP）反应。研究起始样本量（细胞，组织）要是组蛋白的10倍，一般每个反应至少需要107个细胞。另外有些转录因子比较大，往往结合多个核小体，因此在染色质断裂的时候，不太适合使用酶法的处理方式，建议使用超声断裂染色质的方法。因为酶法是化学处理，消化的位点往往比较均一，多是在核小体的连接处，酶消化有可能将核小体断裂的同时打断转录因子与DNA的结合。

**3.染色质为什么要片段化？片段化的长度为什么是200-1000？片段化过度或不足对实验会有什么影响？**

片段化的目的是确保高分子量染色质的蛋白质/DNA复合物是可溶的，能被ChIP抗体接近；为确保染色质免疫共沉淀（ChIP）实验有良好精度，一般片段化的大小在200-1000bp，一般300-600bp均能获得较好的ChIP结果。如果小于200bp的话，蛋白的结合位点很有可能被打断，原因是由于每个核小体结合DNA的序列长度为175bp，加上不同核小体间的linker DNA序列，这样每个核小体结合DNA的最小序列大概在200bp左右，如果片段长度大于1000bp，您将会分离获得包含目标序列的DNA，但所要研究的蛋白可能会离您目标序列有700个核苷酸的距离；如果过度片段化可能破坏抗原表位降低PCR效率，片段化不全导致样本丢失，可能会获得假阴性结果。

**4.在免疫沉淀的时候，样本，抗体和磁珠加样和反应顺序对实验结果有什么影响？有要求吗？**

一般有3种反应顺序：染色质样本+抗体先反应，然后加磁珠；抗体+磁珠先反应，然后加染色质抗体；染色质样本+抗体+磁珠 三者同时反应。 无论选择哪种微珠，使用磁珠或琼脂糖珠的顺序可能影响您的ChIP信号。第一种方法先将微珠与捕获抗体共同孵育（室温下几小时，或4°C过夜），接着加入染色质（样本），继续孵育（4°C震荡孵育1小时至过夜）。增加孵育时间有可能增加背景和ChIP信号；然而，与靶点亲和力低的抗体即使延长（过夜）孵育，也不产生明显的ChIP信号。第二种方法将抗体与染色质样本先共同孵育，再加入微珠也能获得和第一种反应顺序相似的结果，均能较好的进行免疫沉淀反应。

但是不建议同时加入这三个组分进行免疫沉淀反应，有实验验证显示同时加入三个组分虽然能减少开展整个反应所需的时间，但是和上述两种方法相比，结果较差。

**5.染色质免疫共沉淀（ChIP）实验中最关键的结果是什么？什么样的富集倍数被认为是阳性的结果？**

[染色质免疫共沉淀（ChIP）](http://www.zoonbio.com/antibody-service-index-Testing-ChIP.html)实验本身其实就是一个通过免疫沉淀反应验证蛋白与DNA相互作用的实验。因此结果一般包括两个数据：免疫沉淀的效率（富集效率）, 蛋白与DNA结合能力（富集倍数）。但是这两个结果本身都是一个相对值，因为富集效率就是断裂后的染色质分成两部分，一部分进行免疫沉淀，一部分作为对照不进行免疫沉淀，然后两者进行比较，得到一个百分比。富集倍数就是取两个抗体进行免疫沉淀，一个是特异性的抗体，另一个是阴性抗体（和特异性抗体同种属的lgG）验证抗体是否有非特异性的结合，然后将这两个抗体获得的DNA进行比较，得到一个比值。因此无论是富集效率还是富集倍数其实都只是一个相对的结果，没有特定的数值，富集倍数的高低往往取决于蛋白质靶点的丰度，相对于低丰度的靶点，高丰度靶点有可能产生高的富集。一些实验室将相对于IgG对照的5倍富集设为成功实验的最低阈值。不过，最好将结果与已发表的结果比较，而不是固守设定值。

**6.ChIP实验中DNA的检测在什么情况下用PCR反应？什么情况下用测序？**

当我们已知蛋白结合的DNA序列的时候，可以使用PCR反应进行检测，PCR可以使用End point PCR和Q-PCR方法，在PCR的时候除了样本组外，还需要设置input 对照，阴性对照和空白对照。PCR扩增片段长度200-400bp最佳，模板DNA片段过长，结合位点的邻近DNA会出现一定程度的信号富集。

但是有些情况下，蛋白结合的DNA序列是未知的，这时我们需要使用ChIP结合测序（Seq）方法检测，染色质免疫共沉淀测序（ChIP-Seq）一般包括3个步骤：染色质免疫共沉淀（ChIP）反应，文库构建和测序。一般有两种方法操作，一种使用普通ChIP试剂盒，获得纯化的DNA，然后交个测序公司，由公司进行文库构建和测序。还有一种叫做ChIP-Seq试剂盒，这种试剂盒一般包括ChIP反应和文库构建，仅需将构建好的文库交给公司进行测序即可。