

技术指南

染色质免疫沉淀 (ChIP) 指南： 成功的关键因素



关注默克密理博微信查抗体
技术及现货信息尽掌握

CALBIOCHEM®
Calbiochem 小分子 大智慧
信号通路抑制剂行家之选
稳定 放心 创新

CHEMICON®
INTERNATIONAL
Chemicon 权威品质 成就发现
干细胞和神经研究金标准

upstate
cell signaling solutions
UpState 历史悠久 精益求精
表观遗传及信号通路研究领跑者

Merck Millipore is a division of **MERCK**

目 录

1. 简介	3
1.1. 染色质免疫沉淀	4
2. ChIP的靶点	5
2.1. ChIP中的组蛋白	5
3. ChIP实验	8
3.1. 样品制备	10
3.1.1. 收集样本	10
3.1.2. 蛋白质与DNA交联	11
3.1.3. 细胞裂解	11
3.1.4. 染色质断裂	12
3.2. 免疫沉淀	13
3.2.1. 单克隆或多克隆抗体?	13
3.2.2. ChIP的对照抗体	14
3.2.3. 特异性检测	14
3.2.4. 验证检测	16
3.2.5. ChIP抗体的应用	17
3.2.6. 洗涤免疫沉淀物	18
3.3. 洗脱和交联逆转	18
3.4. 实时定量PCR (qPCR)	19
3.4.1. qPCR反应的效率	20
3.4.2. 数据分析	21
4. Troubleshooting	22
5. 补充操作	25
5.1. 制备ChIP实验的细胞	25
5.2. 制备ChIP实验的组织	25
5.3. 优化超声处理和分析DNA片段	26
5.4. DNA纯化	26
6. 简化ChIP的试剂盒及分析	27
一天完成的ChIP试剂盒	27
用于组织的ChIP试剂盒	27
高通量ChIP试剂盒	28
全基因组ChIP试剂盒 – 二代测序	29
全基因组ChIP试剂盒 – 芯片分析	29
Absurance™ 组蛋白H2、H3、H4抗体特异性芯片	30
表观遗传学研究新技术及工具	31

真核生物的细胞核是个动态的环境，包含功能上相关的核酸、细胞骨架结构，以及维持蛋白和信号蛋白。细胞核的遗传成分被包装成染色质。而染色质是由核小体单位组成的复合物，每个核小体由大约147 bp DNA盘绕在组蛋白亚基（H2A、H2B、H3和H4，每种两个）的周围而形成。染色质的结构有时是高度压缩的异染色质，其中转录复合物无法接近DNA序列，而有时是展开的常染色质结构，允许蛋白质对DNA进行调控。染色质的结构以及DNA包装对基因表达的控制受到表观遗传机制的影响，这涉及到许多酶的活性，对组蛋白及其他蛋白进行修饰，以响应细胞内的信息。

表观遗传学通常被形容为不改变DNA序列的遗传变化。这些变化具体包括DNA甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑以及经由非编码RNA的信号通路。尽管基因组保持相对静止，但互补的表观基因组适应环境影响，并为不同的细胞类型、组织和生物体赋予独特的，在某些情况下可遗传的特征和表型。表观基因组也许反映了复杂疾病如何形成、发展，并从父母向子女转移。因此，必须监控和鉴定表观遗传学信号，以便全面地了解疾病，并开发出适当的生物标志物，这些标志物可用于诊断，并作为治疗干预的靶点。

与表观遗传机制相关联的复杂疾病

癌症
宫颈癌
结肠直肠癌
肺癌
胃癌
白血病
头颈部鳞状细胞癌
前列腺癌
肝细胞癌
粘液表皮样癌
胰腺导管内乳头状粘液性肿瘤
食管鳞状细胞癌
口腔鳞状细胞癌
Beckwith-Wiedemann综合征
Prader-Willi综合征
Angelman综合征
假性甲状旁腺功能减退
ICF综合征
Rett综合征
全身性红斑狼疮
动脉粥样硬化
自动内膜异位症
Fragile X综合征
阿尔茨海默病
精神分裂症
抑郁症
自闭症
焦虑症

Upstate(现在是默克密理博的一部分)在上世纪90年代开发出了世界上第一个ChIP试剂盒。以此为起点，默克密理博陆续推出了众多ChIP技术产品，并形成了明显优势：

- 样品准备更高效
- 一天内完成实验
- 高通量ChIP
- 全基因组分析
- 对组织样品的专用ChIP
- 优化、专业化的实验方案
- 兼容自动化平台
- 经ChIP验证的可靠抗体
- 蛋白A, G和A/G磁珠
- 多选的检测方法

1.1 染色质免疫沉淀

对于疾病的表现遗传机制研究，染色质免疫沉淀（ChIP）是最有力的工具之一。ChIP能够检测并相对定量体内单个或多个位点上特异的蛋白质-DNA以及蛋白质之间的相互作用。ChIP包括蛋白质与DNA序列的交联，随后是交联复合物的免疫沉淀，以及通过终点或定量聚合酶链式反应（qPCR）、芯片（ChIP-chip）或新一代测序（ChIP-seq）对产生的DNA进行分析。

即使对经验最丰富的研究人员而言，ChIP也颇具挑战性。这是一个多步骤的技术，需要高质量的染色质、强有力的抗体、优化的试剂和好的操作方案能以产生重复可靠的结果。这些可利用商业化的产品和方案来实现，也可开展多个验证实验。无论您偏爱哪种策略，这本手册都将指导您处理ChIP中普遍遇到的一些问题，从样品制备到DNA分析。

► CHIP 提示

您能够利用ChIP来发现：

- 被特定靶蛋白占据的DNA序列
- 在指定的细胞条件下，特定蛋白质（如转录因子）在整个基因组上的结合位点和分布
- 基因转录和聚合酶活性
- 与疾病表型相关的复杂的DNA/蛋白质相互作用
- 蛋白质（如组蛋白）的修饰，这可能影响染色质结构和基因表达
- 核小体结构和染色体维持的调控

ChIP 数据示例

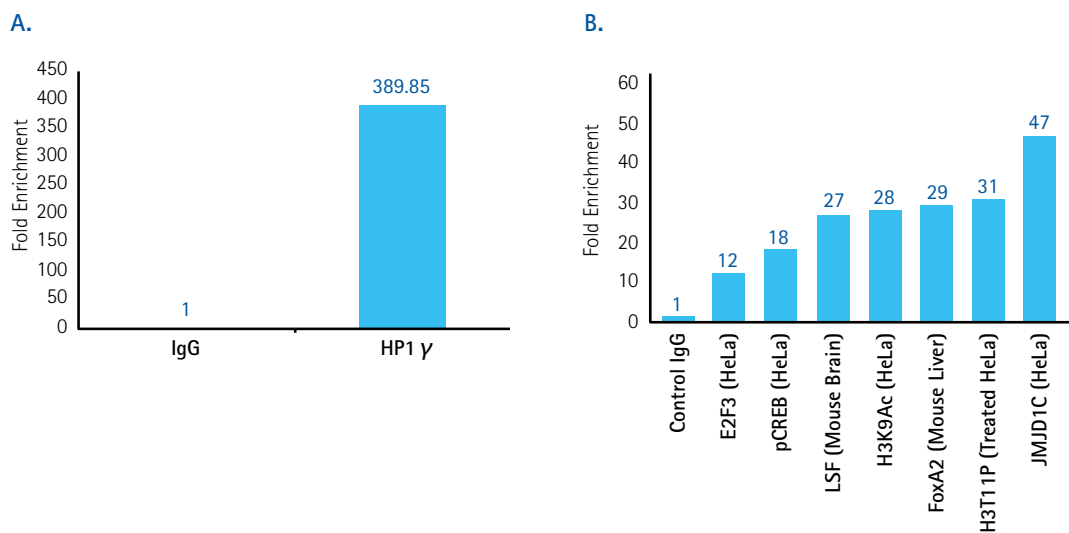


图1. (A) 与异染色质蛋白1d γ (HP1 γ)，一种重要的基因抑制标志物，相关的DNA序列的成功ChIP富集。数据是利用默克密理博的ChIPAb+™ Hp1 γ 抗体/引物套装、小鼠IgG（非特异对照）以及默克密理博的Magna ChIP™ G kit（货号17-10085）获得的。

(B) 多个蛋白质靶点的高通量（96孔板）ChIP分析，以检测不同条件下的多个基因位点，使用默克密理博的抗体panel和Magna ChIP™ HT96 Kit（货号17-10077）。

ChIP需要表位高度特异的抗体，它们识别天然染色质状态或可能的交联构象下的蛋白质或感兴趣的修饰残基。因此，有些蛋白质靶点或表位可能更难开展ChIP，因为与其他蛋白质关联，或表位通过其他方式遮蔽。然而，考虑到各种抗体候选，许多核蛋白也是可ChIP的。目前有越来越多的商业抗体，能检测许多关键的ChIP靶点，如组蛋白和组蛋白修饰、转录因子、辅助因子、核酶，以及维持和修复DNA的蛋白质。

关于更多信息，请访问

www.merckmillipore.com/antibodies

在您开始ChIP实验之前，您需要了解ChIP靶蛋白的性质，这一点很重要。考虑下列问题：

- 您的ChIP靶蛋白是否表达，在哪些条件下表达？
- 它是否在信号刺激下发生修饰？
- 在您感兴趣的条件下，它是否位于细胞核内？
- 它是高丰度还是低丰度的靶蛋白？
- 它是直接与DNA结合，还是通过蛋白质之间的相互作用？
- 它是否与染色质紧密相关，如组蛋白？
- 它的分析是单个位点还是多个位点？

2.1 ChIP中的组蛋白

组蛋白和经过修饰的组蛋白是最丰富、也是最广泛研究的ChIP靶点，因为它们经过各种与生物学功能相关联的翻译后修饰。组蛋白家族包括五种亚型：H1、H2（及其变体）、H3和H4。组蛋白H2、3和4形成核小体的核心结构，而H1是连接蛋白，有助于染色质内核小体的组装。

组蛋白经历了多种翻译后修饰（PTM）：甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化、SUMO化、瓜氨酸化、生物素化、巴豆酰化和ADP核糖基化（详见图2）。

这些翻译后修饰（PTM）可能改变染色质的结构，让它更难或更容易被转录复合物接近。乙酰基团添加到组蛋白的赖氨酸残基上，这一过程由组蛋白乙酰转移酶（HAT）催化，减少了组蛋白与DNA分子之间的静电相互作用，使得染色质结构不太稳定，更容易被转录复合物接近，从而导致基因激活。相反，组蛋白脱乙酰酶（HDAC）去除这一化学基团，往往实现转录抑制。同样，最多三个甲基基团也可通过甲基转移酶添加到H2A、H2B、H3和H4的赖氨酸和精氨酸残基上，这取决于所修饰的残基。

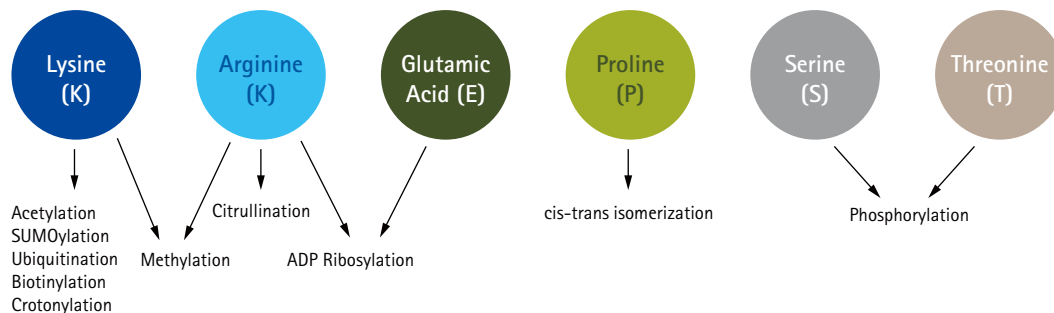


图2. 组蛋白残基和相关的翻译后修饰。改编自 Latham et al, (2007)。详见 <http://www.nature.com/nsmb/journal/v14/n11/full/nsmb1307.html>

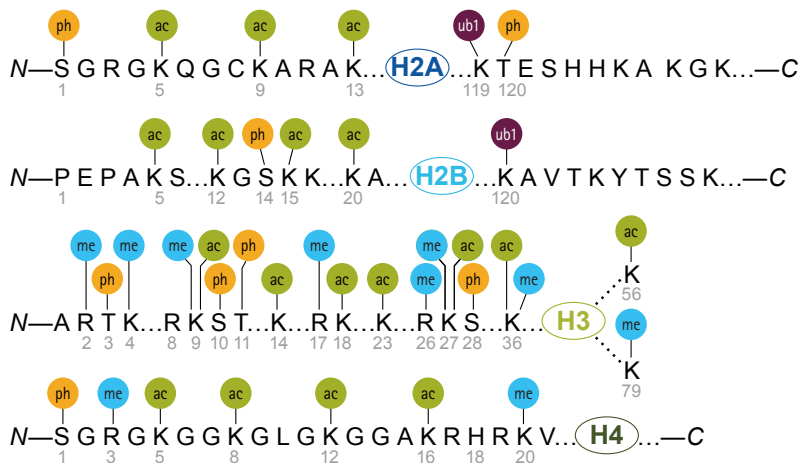


图 3: 经常研究的组蛋白翻译后修饰的序列位置:

- ph 磷酸化
- ac 乙酰化
- ub 泛素化
- me 甲基化

图像改编自Latham et al., 2007. 详见 <http://www.nature.com/nsmb/journal/v14/n11/full/nsmb1307.html>

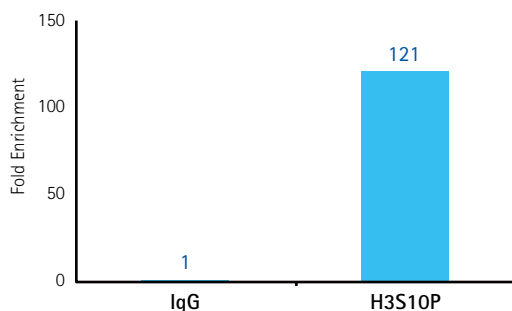


图4. 数据是利用默克密理博的ChIPAb[™] Phospho-Histone H3 (Ser10) 抗体/引物套装 (货号 17-685)、小鼠IgG (非特异对照) 和默克密理博的Magna ChIP[™] A/G Kit (货号 17-10085) 获得的。

组蛋白的甲基化可以导致基因表达或抑制, 这取决于甲基化的位点。例如, 组蛋白H3第9和27位赖氨酸的甲基化是异染色质形成的标志, 与蛋白质polycomb group的活性相关而, H3第4和36位赖氨酸的甲基化则表示常染色体、基因激活和trithorax蛋白的关联。

所有组蛋白的多个丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基都经历了磷酸化, 这对于转录、染色质结构、DNA损伤通路和凋亡都有着不同的影响。在有丝分裂过程中, 组蛋白H1和H4 (第1位丝氨酸) 都发生位点特异的磷酸化, 而组蛋白H3 (第10和28位丝氨酸) 的程度更高, 这或促进染色质的凝聚和分离, 或促进染色质的解聚。特别是, 磷酸化组蛋白H3的第10位丝氨酸已经过充分鉴定: 它可在G2期到中期检测到, 通常作为有丝分裂细胞的标志。此外, 组蛋白磷酸化可能在DNA损伤应答通路和凋亡中发挥作用。组蛋白变体H2A.X是第139位的丝氨酸被ATM/ATR激酶磷酸化, 以响应双链DNA的断裂, 可能引起DNA修复蛋白的招募。这些组蛋白修饰也可能引发组蛋白亚基替换, 这涉及到一系列酶和伴侣蛋白。

总的来说, 不同的组蛋白修饰模式, 所修饰的组蛋白残基的数量, 以及这些修饰的时空关系 - 这些通常被称为“组蛋白密码 (histone code)” - 最终决定了对染色质和DNA的影响。

确保ChIP的成功

ChIPAb+™ 经过ChIP验证的组蛋白抗体/引物套装

Description	Catalogue No.
ChIPAb+™ Histone H2A.Z	17-10048
ChIPAb+™ Histone H2B	17-10054
ChIPAb+™ Histone H3 (C-term)	17-10046
ChIPAb+™ Histone H3 (Unmod Lys4)	17-675
ChIPAb+™ Acetyl Histone H3	17-615
ChIPAb+™ Acetyl-Histone H3 (Lys4)	17-10050
ChIPAb+™ Acetyl-Histone H3 (Lys9)	17-658
ChIPAb+™ Acetyl-Histone H3 (Lys14)	17-10051
ChIPAb+™ Monomethyl Histone H3 (Lys27)	17-643
ChIPAb+™ Dimethyl-Histone H3 (Lys4)	17-677
ChIPAb+™ Dimethyl-Histone H3 (Lys9)	17-648
ChIPAb+™ Trimethyl-Histone H3 (Lys4)	17-614
ChIPAb+™ Trimethyl-Histone H3 (Lys4)	17-678
ChIPAb+™ Trimethyl-Histone H3 (Lys9)	17-625
ChIPAb+™ Trimethyl-Histone H3 (Lys27)	17-622
ChIPAb+™ Trimethyl-Histone H3 (Lys36)	17-10032
ChIPAb+™ Trimethyl-Histone H3 (Lys79)	17-10130
ChIPAb+™ Phospho-Histone H3 (Ser10)	17-685
ChIPAb+™ Acetyl Histone H4	17-630
ChIPAb+™ Acetyl-Histone H4 (Lys5)	17-10045

我们还提供更多ChIPAb+™ 经过验证的抗体/引物套装。

从经过各种免疫分析验证的200多种组蛋白抗体中选择。

关于更多信息，请访问：www.merckmillipore.com/epigenetics

有现货的ChIPAb+™，现货一周达：

Description	Catalogue No.
ChIPAb+™ Acetyl-Histone H4 (Lys5)	17-10045
ChIPAb+™ Acetyl-Histone H3 (Lys14),	17-10051
ChIPAb+™ Acetyl-Histone H4 (Lys8)	17-10099
ChIPAb+™ Acetyl-Histone H4 (Lys16)	17-10101
ChIPAb+™ Dimethyl-Histone H3 (Lys27),	17-10108
ChIPAb+™ Sp1	17-601
ChIPAb+™ ERa	17-603
ChIPAb+™ HDAC1	17-608
ChIPAb+™ Trimethyl-Histone H3 (Lys4)	17-614
ChIPAb+™ Acetyl Histone H3	17-615
ChIPAb+™ RNA Polymerase II	17-620
ChIPAb+™ Trimethyl-Histone H3 (Lys27)	17-622
ChIPAb+™ Trimethyl-Histone H3 (Lys9)	17-625
ChIPAb+™ Acetyl Histone H4	17-630
ChIPAb+™ Dimethyl-Histone H3 (Lys9)	17-648
ChIPAb+™ Acetyl-Histone H3 (Lys9)Purified	17-658
ChIPAb+™ EZH2, clone AC22	17-662
ChIPAb+™ Dimethyl-Histone H3 (Lys4)	17-677
ChIPAb+™ Acetyl-Histone H3 (Lys27)	17-683

ChIP实验

ChIP实验可被分为5个主要步骤：

- 交联和收集细胞
- 细胞裂解和染色质断裂
- 免疫沉淀
- 洗涤、洗脱和交联逆转
- DNA纯化和PCR分析

对于一个标准的ChIP实验，这5个步骤通常在2-3天内完成，但通过替代方案，在1天内完成一个完整的ChIP实验也是可能的。对于1天的ChIP实验，我们建议使用Magna ChIP™ protein A/G kit（货号 17-10085）或EZ-Magna ChIP™ protein A/G kit（货号 17-10086）等试剂盒。快速方案试剂盒提供了一整套经过优化的试剂，在某些情况下，还提供对照抗体和PCR引物。快速和标准方案的最大区别在于免疫沉淀所需的时间不同。在针对高丰度靶蛋白使用经过ChIP验证的抗体时，建议使用快速方案。而在使用未经验证的抗体或研究低丰度靶蛋白时，使用标准方案。关于详细的操作方案，请下载Magna ChIP™ 用户手册（货号 17-10086）。关于试剂盒、抗体和染色质免疫沉淀所用磁珠的更多选择，您也可以访问：www.merckmillipore.com/epigenetics

一个标准的ChIP实验需要：

- 培养的细胞或组织样品
- 培养基
- 交联试剂
- 甘氨酸
- 细胞裂解试剂
- 蛋白靶点的特异抗体
- 对照抗体
- 与Protein A和/或Protein G结合的磁珠或琼脂糖珠
- 蛋白酶K
- 洗涤和洗脱液
- 琼脂糖电泳的试剂
- PCR引物和试剂

步骤	快速方案 (1天)	标准方案 (2-3天)
交联和收集细胞	0.5小时	0.5 小时
细胞裂解和染色质断裂	0.76小时	0.76 小时
免疫沉淀	2 小时	过夜
洗涤、洗脱、交联逆转	3 小时	3 小时
DNA纯化、PCR	3 小时	3 小时

可靠、无忧的结果

染色质免疫沉淀试剂盒：

ChIP试剂盒为开展ChIP实验提供了即用且可靠的方法。在默克密理博，我们提供了多种ChIP试剂盒，它们基于磁珠和琼脂糖珠。磁珠利用磁性分离装置来处理，通常是开展ChIP的实验室的首选，因为操作简单，且磁珠的回收更好、更可靠。



Magna ChIP™ 试剂盒提供

- 一整套经过优化和质量控制的试剂，经证明适用于ChIP
- 详细的操作方案，适用于细胞和组织
- 节省时间：无需配制试剂和开展多个验证及troubleshooting实验
- 更快的方案，利用磁珠让ChIP实验1天内完成
- 高级的方案，让96个ChIP反应一次在单块板上完成
- 阳性和阴性对照：EZ-Magna ChIP™和EZ-ChIP™试剂盒带有IgG
- 对照和精心设计的qPCR引物
- 全基因组试剂盒，适用于芯片和ChIP-seq分析
- 专业的技术支持和troubleshooting

Description	Catalogue No.
Magna ChIP™ A Kit	17-610
Magna ChIP™ G Kit	17-611
EZ-Magna ChIP™ A Kit	17-408
EZ-Magna ChIP™ G Kit	17-409
Magna ChIP™ A/G Kit	17-10085
EZ-Magna ChIP™ A/G Kit	17-10086
Magna ChIP™ HT96 Kit	17-10077
EZ-Magna ChIP™ HT96 Kit	17-10078
Magna ChIP-Seq™ Chromatin Immunoprecipitation and Next Generation Sequencing Library Preparation Kit	17-1010
Magna ChIP2™ Universal Chromatin Immunoprecipitation DNA Microarray Kit	17-1000
Magna ChIP2™ Universal Chromatin Immunoprecipitation DNA Microarray Quad Kit	17-1004
Magna ChIP™ G Tissue Kit	17-20000
Magna ChIP™ Protein A+G Magnetic Beads	16-663
Magna ChIP™ Protein G Magnetic Beads	16-662
Magna ChIP™ Protein A Magnetic Beads	16-661
ChIP Assay Kit (Agarose)	17-295
EZ-ChIP™ Kit (Agarose)	17-371

关于ChIP试剂盒的更多详情，请参阅第27-30页

3.1. 样品制备

3.1.1. 收集样本

► 目标：为了制备足够量的适用于ChIP实验的培养细胞或组织切片/样品

ChIP实验可在培养的细胞或组织上开展。在任何情况下，都必须考虑您样品的均质性，因为每个有贡献的细胞类型可能有着不同的染色质结构。同时还必须确定您将要开展多少个ChIP反应。每个ChIP反应所需的细胞数量将取决于蛋白质靶点的丰度。在决定每个ChIP反应所需的“染色质对应的细胞量”时，需要考虑的因素包括您细胞中的可用表位数量，以及您抗体的质量（亲和力和特异性）。如果您使用高质量的抗体来靶定高丰度的表位，如RNA聚合酶II及一些类型的组蛋白修饰，每个ChIP只用 1×10^4 个细胞也能实现成功富集。当抗体并非最佳或每个细胞的表位数很低时，我们建议您增加细胞数量。表1和2为每种类型的蛋白质靶点所需的细胞数量提供了指南。

您应当根据您的抗体性能来缩放细胞数量，以优化相对于非特异对照（正常IgG或阴性位置对照）的最高信噪比。

组织样品包含异质的细胞群体，对ChIP而言更具挑战性。您可以使用冰冻切片或新鲜组织，切成 $1-3\text{mm}^3$ 的切片。ChIP所使用的组织量将取决于组织类型，您的蛋白质靶点的相对丰度，以及您的ChIP抗体的可靠性。一般而言，一颗豌豆大小的组织约含 10^7 个细胞，足够作为100个ChIP实验的样品。然而，此数值的准确性取决于组织的相对细胞结构和污染的细胞外基质的量。您应当小心而迅速地处理组织样品，将样品置于冰上，以保证样品的完整性。

表1: ChIP¹的细胞数量指南

蛋白质靶点的丰度	每个位点的分子	细胞/ChIP	例子
高	高	10^4	修饰的组蛋白、RNA聚合酶II
中	中	10^5-10^6	通用转录因子、修饰基因（TFIID、PCG）
低	低	10^6-10^7	序列特异的转录因子
低	间接结合	10^7 或更多	辅助因子

表2: 终点分析的细胞数量指南

应用	所需的ChIP DNA的数量	细胞数量
qPCR	皮克 – 纳克	10^5
ChIP-seq	~1-10 ng	10^6
ChIP-chip	~10-100 ng	10^8

¹. 假设使用高质量、高亲和力的抗体

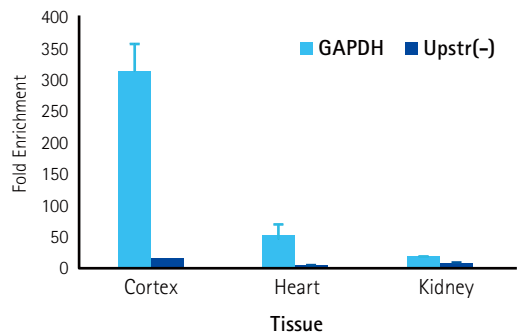


图5: RNA聚合酶II与GAPDH启动子的组织特异定位，利用Magna ChIP™ G Tissue Kit（货号 17-20000）和 Anti-RNA Polymerase II clone CTD4H8（货号 05-623B）进行实验。我们利用1 μg抗体来免疫沉淀各种小鼠组织的染色质。之后利用小鼠GAPDH启动子特异的引物通过qPCR对免疫沉淀的DNA进行分析。利用qPCR扩增免疫沉淀的染色质片段，数据以相对于独立实验中IgG相关DNA的富集倍数显示。富集倍数是利用Dhfr基因上游的引物（UpStr (-））通过qPCR评估的。

3.1.2. 蛋白质与DNA交联

► 目标：稳定蛋白质与DNA的体内结合

目标：稳定蛋白质与DNA的体内结合

交联稳定了您的蛋白质靶点与相互作用的DNA序列的结合。在某些情况下，蛋白质靶点已与DNA紧密结合，则在实验分析过程中，就不需要其他的化学交联，来保留蛋白质/DNA复合物。这被称为native ChIP，或N-ChIP。N-ChIP适用于组蛋白和组蛋白修饰等靶点。然而，值得注意的是，没有额外交联，核小体上的体内修饰在您的分析过程中仍时有发生。

在靶定与DNA结合较弱的蛋白质时，我们强烈建议使用交联ChIP（X-ChIP）的方案。X-ChIP可利用紫外光、甲醛或其他的化学交联剂开展。对于活体样品制备，甲醛交联通常是首选，因为这种修饰是可逆的，让您能分离并扩增ChIP富集的DNA。此外，甲醛的交联距离只有2 Å（0.2 nm），确保您交联的是已经与DNA紧密结合的蛋白质。甲醛也将在DNA结合蛋白和与之相结合的蛋白之间形成交联，有助于蛋白质/DNA间接相互作用的研究。甲醛交联能够承受后续的实验操作，让您能分离出完整的蛋白质/DNA复合物。不过，甲醛有时候会产生非特异的交联。

► CHIP提示

- 标准的甲醛交联条件是1%甲醛在室温下交联10分钟。交联时间最多可延长至20分钟，以促进较弱或间接作用的蛋白质与蛋白质或蛋白质与DNA的分离。
- 只使用分子生物学级别的甲醛：甲醛是用甲醇稳定的，一旦甲醇蒸发，甲醛可能会形成白色沉淀。请勿使用含有此沉淀的甲醛。
- 长时间交联可能遮蔽蛋白质靶点的表位，并降低您的ChIP抗体的结合效率。
- 交联不当可能导致随后操作步骤中您的蛋白质/DNA复合物的损失。
- 在交联试剂处理过程中，细胞或组织的条件需要考虑（即存在培养基 vs. 磷酸盐缓冲液）。培养基包含的分子可能与甲醛相互作用，潜在消耗甲醛分子，并降低交联的预期效率。

3.1.3. 细胞裂解

► 目标：破坏细胞和/或核膜，以分离出交联的蛋白质/DNA

细胞裂解有助于细胞核的释放，并去除细胞质中可能造成背景信号的组分。您ChIP分析的成功将取决于裂解过程的效果和染色质的最终回收。一些ChIP操作指定使用含有高浓度SDS的裂解缓冲液，这裂解整个细胞，而其他一些操作指定使用细胞核分离的缓冲液。

裂解是通过在适当浓度的去污剂缓冲液和蛋白酶抑制剂混合物中孵育而实现的。我们也建议您通过机械力来裂解，使用dounce匀浆器、Mini-beadbeater匀浆器、涡旋振荡器或玻璃珠。您选择的方法将取决于您要处理的细胞或组织的类型。如果细胞裂解对您颇具挑战性，那么在裂解前后通过相差显微镜来观察样品可能会有帮助。这将让您能确定细胞核是否从细胞中释放，或是否使用全细胞裂解液，整个细胞或核膜是否已被破坏。

3.1.4. 染色质断裂

- ▶ 目标：将染色质打断成适合ChIP的长度（200 – 1000 bp）

断裂以确保高分子量染色质的蛋白质/DNA复合物是可溶的，能被您的ChIP抗体接近。您所选择的断裂方法应取决于您是开展N-ChIP还是X-ChIP（详见3.1.2）。如果您开展N-ChIP，您应当用适当的酶（如微球菌核酸酶）将DNA片段化，因为机械剪切方法会破坏天然的组蛋白/DNA结合。如果您开展X-ChIP，您可以选择超声破碎或酶促消化，以使您的DNA片段化。在任一种情况下，必须优化剪切条件，且每次实验严格使用相同的条件，以减少起始染色质变化的可能性。

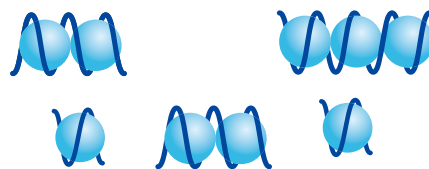
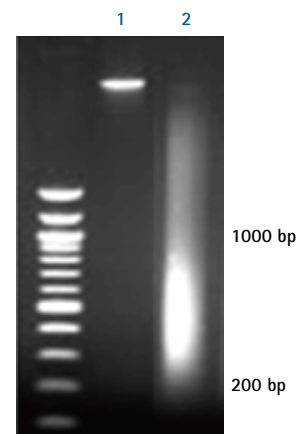


图6：染色质片段的长度应介于200至1000 bp之间

图7：经过超声破碎（第2泳道）或无超声破碎（第1泳道）、蛋白酶消化、交联逆转、提取和沉淀后，已纯化的DNA片段的琼脂糖凝胶电泳分析。我们建议您在每次超声破碎实验后在琼脂糖凝胶上分析DNA。



▶ CHIP提示

- 重复已发表的剪切方案而无需优化可能颇具挑战性。当您的仪器不同于那些方案中所使用的仪器时，尤其如此。目前有各种超声破碎仪器，水浴和基于探头的。在使用基于探头的超声破碎仪时，选择一个适用于您的样品体积的探头。在任何情况下，剪切参数都应当根据您的样品体积、细胞密度和细胞类型而优化。
- 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。这个大小很重要，因为下游分析通常只检测大小为100 – 200 bp的扩增子，包含一个感兴趣的结合位点。为了成功优化，每个优化实验只优化一种参数；例如，让功率设置保持不变，而改变循环数。
- 超声破碎的效率也因每种细胞类型以及细胞数量而不同。对于不同的细胞或组织类型，您需要开展单独的优化。
- 注意时间和功率设置。过度破碎和太高功率设置会损害您用在免疫沉淀步骤中的表位。这将降低您的ChIP信号。
- 始终保持裂解液冰冷，并间断超声，而不是连续，因为超声处理产生热量，会使染色质变性。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。
- 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。为了获得最佳的大小，您应当开展额外的纯化步骤，以便在电泳前纯化DNA。剪切不足所产生的大的不溶蛋白质:DNA:RNA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。

注意，异染色质可能耐受超声破碎，这可能会降低染色质的产量。

3.2. 免疫沉淀

► 目标：使用适当的抗体从染色质提取物中分离蛋白质靶点/DNA复合物

3.2.1. 单克隆还是多克隆抗体？

选择一个适当的ChIP抗体是ChIP实验迈向成功的最关键步骤之一。即使是最高质量的抗体，在Western blot验证中表现很好，也可能不适用于ChIP。最好只考虑那些专门为ChIP验证过的抗体。如果您的抗体未经过专门的质量控制和ChIP验证（如ChIPAb+™经过验证的抗体/引物套装），我们建议您评估几种可能的抗体，再选择一个用于您真正的ChIP实验。以下是您选择抗体时需要考虑的因素。

单克隆或多克隆抗体都适用于ChIP。单克隆抗体识别蛋白质靶点上的特定表位。单克隆的优势在于高度特异，非特异结合的倾向较低。此外，单克隆抗体的每个批次更加一致，因为它们克隆性质的可变性低。不过，如果被单克隆抗体识别的表位被遮蔽或在之前的步骤中被改变，如交联，则单克隆抗体将无法分离出您的蛋白质靶点和与其结合的DNA序列。幸运的是，这种遮蔽很少影响单克隆抗体。

与之相反，多克隆抗体识别蛋白质靶点的多个表位。因此，即使少数表位因交联而遮蔽，但多克隆抗体可能更有效。不过，因为多克隆识别多个表位，这就增加了非特异结合的可能性。此外，还必须考虑到多克隆群体的特异性可能在免疫过程中随时间而变化，除非在制备或纯化前将所有血清合并，再进行抗体纯化。一个相关的问题是，大多数商业化的多克隆抗体存在批间差异。变化的程度将取决于供应商的生产和质量控制措施。例如，多克隆抗体的量比较有限。如果对抗体的需求量高，往往需要从宿主动物的免疫开始，再次生产多克隆抗体。

因此，这些抗体的特异性和亲和力就存在批间差异。较大的抗体制造商，如默克密理博，能够免疫多只动物，并筛选和合并那些表现出适当亲和力和特异性的材料，从而解决这个问题。为了确保一致性，最终抗体的性能可与之前的批次进行比较。无论您选择单克隆还是多克隆抗体，在选择ChIP的商业化制备抗体时，理想的抗体将带有证明特异性的数据，以及显示在ChIP及其他关键应用中性能可靠的数据。

► ChIP提示

- 无论您为ChIP实验选择单克隆还是多克隆抗体，您都必须根据您的特定分析来优化您抗体的稀释度。如果使用过量的抗体，您在蛋白质靶点的免疫沉淀中会获得成功，但您也会观察到过高的非特异结合或降低的特异信号。相反，如果您使用过少的抗体，您将观察到靶点的回收率低，如图8所示。
- 为了获得最佳的结果，ChIP抗体应经过充分鉴定，证明它能与蛋白质靶点结合，经过严格的特异性检测，最好经过ChIP的验证。
- 仅仅因为抗体在Western blot中表现不错，也不一定表明它在染色质免疫沉淀中表现佳。与Western blot检测变性的蛋白质不同，ChIP的抗体必须能识别天然状态下的蛋白质靶点。

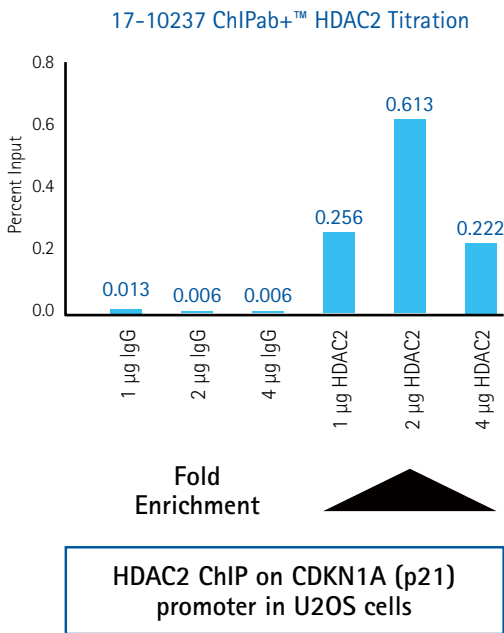


图8：加入抗体量的滴定实验以获得最大化的ChIP富集。

3.2.2. ChIP的对照抗体

染色质是一种由蛋白质与核酸结合而成的复杂混合物。为了确保有效的结果，ChIP实验应当包含对照以消除染色质和抗体的非特异性结合，免疫沉淀磁珠，以及ChIP实验获得的DNA用于分析。为了控制您的ChIP抗体的特异性，您应当在ChIP实验中包含以下对照：

- 阴性对照抗体：使用与您的ChIP抗体有着相同物种和形式（如纯化的naïve血清，或腹水）的阴性对照IgG。例如，如果您使用正常的纯化小鼠单克隆ChIP抗体，则使用正常的纯化小鼠IgG作为您的阴性对照。如果您使用纯化的兔多克隆ChIP抗体，则使用正常的纯化的兔IgG作为阴性对照抗体。或者，如果没有适当的阴性对照IgG，您可以选择使用“无抗体”或只有磁珠的方法。尽管匹配的IgG通常是更好的阴性对照，但阴性对照IgG或只有磁珠的对照也可用于富集倍数的计算。
- 阳性对照抗体：使用相同物种的抗体，它们能识别高丰度的蛋白质靶点，如RNA聚合酶II或组蛋白亚基（通常是H3或H4 N端）。阳性对照抗体有助于验证除ChIP抗体选择外的其他影响实验的因素，并对故障排除很有帮助。

3.2.3. 特异性检测

在您选择抗体之前，必须了解抗体的特异性。在使用针对翻译后修饰的蛋白质（如修饰的组蛋白）的抗体时，尤其是这样。您必须确认所使用的抗体只检测包含特定修饰位点的表位。

目前有多种方法来评估抗体的特异性，包括斑点杂交、多肽芯片或多肽抑制分析。一些实验室将开展多种验证方法，特别是对修饰的组蛋白肽段，以便正确评估与相似表位的交叉反应性，例如同一个组蛋白亚基上的二甲基和三甲基加合物。

关于检测组蛋白抗体特异性的可靠方法，我们建议使用AbSurance™组蛋白抗体特异性芯片（货号16-665、16-668和16-667）。这些芯片在PVDF膜上总共提供了89个组蛋白H2、H3和H4的高质量肽段。分析操作像Western blot一样简单，使用标准的化学发光检测系统，而不像芯片方法那样，需要其他的软件或昂贵的设备进行检测。关于AbSurance芯片的更多信息，详见第30页。

图9和10显示了抗三甲基组蛋白H3（Lys4）抗体的特异性严格检测的一个例子，包括AbSurance™组蛋白抗体特异性芯片。多肽抑制分析的特异性评估表明与二甲基组蛋白H3（Lys4）之间的交叉反应性弱。组蛋白多肽芯片，这种分析比多肽抑制分析要简单得多，也表明了与组蛋白H3（Lys4）的二甲基加合物之间交叉反应性的相似模式（详见图10）。

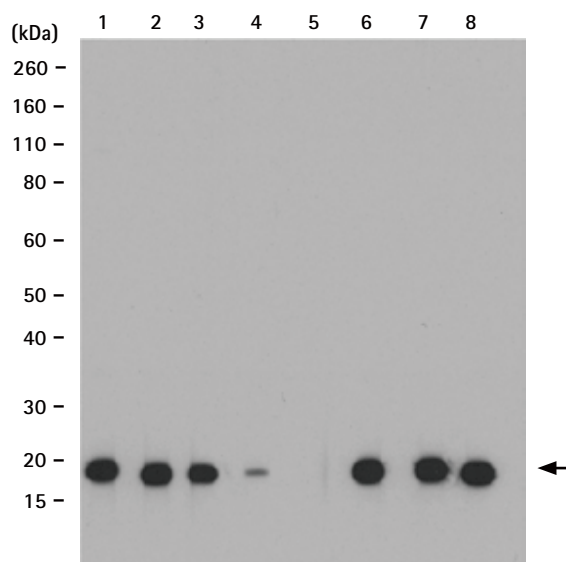
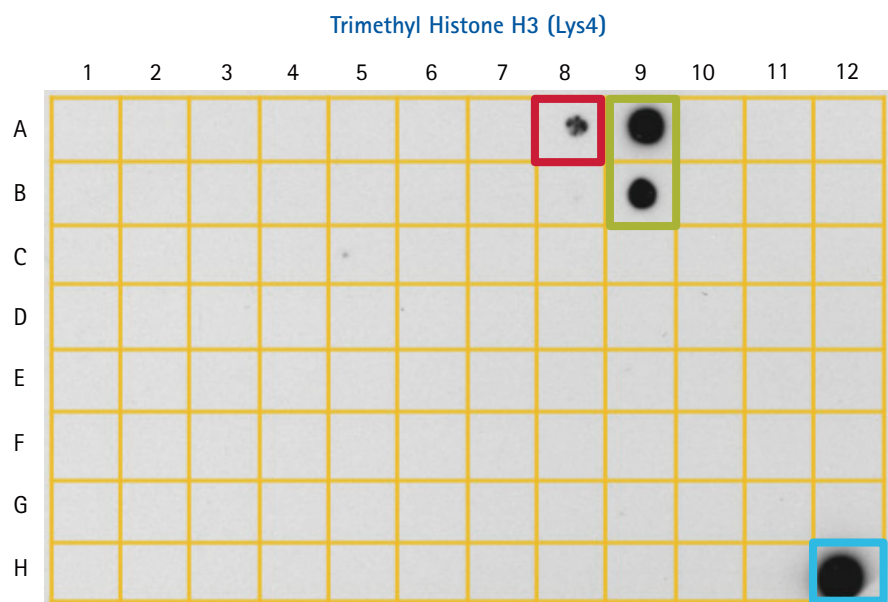


图10：多肽抑制特异性分析：三甲基组蛋白H3（Lys4）（第5泳道）彻底阻断了此抗体的活性，而二甲基组蛋白H3（Lys4）部分抑制了此抗体，表明与此加合物存在弱的交叉反应性。泳道指定部分抑制了此抗体（第4泳道）。

泳道1：无肽段
泳道2：未修饰的H3（Lys4）
泳道3：单甲基H3（Lys4）
泳道4：二甲基H3（Lys4）
泳道5：三甲基H3（Lys4）
泳道6：三甲基H3（Lys9）
泳道7：三甲基H3（Lys27）
泳道8：三甲基H4（Lys20）

箭头指示二甲基/三甲基组蛋白H3（Lys4）（~17 kDa）



Layout of the AbSurance Histone H3 Antibody Specificity Array

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	H3 1-19 unmod	H3 1-19 R2me1	H3 1-19 R2me2a	H3 1-19 R2me2s	H3 1-19 T3P	H3 1-19 K4ac	H3 1-19 K4me1	H3 1-19 K4me2	H3 1-19 K4me3	H3 1-19 R8me1	H3 1-19 R8me2a	H3 1-19 R8me2s	100 ng
B	H3 1-19 unmod	H3 1-19 R2me1	H3 1-19 R2me2a	H3 1-19 R2me2s	H3 1-19 T3P	H3 1-19 K4ac	H3 1-19 K4me1	H3 1-19 K4me2	H3 1-19 K4me3	H3 1-19 R8me1	H3 1-19 R8me2a	H3 1-19 R8me2s	10 ng
C	H3 1-19 K9ac	H3 1-19 K9me1	H3 1-19 K9me2	H3 1-19 K9me3	H3 1-19 S10P	H3 1-19 T11P	H3 7-26 unmod	H3 7-26 K14ac	H3 7-26 R17me1	H3 7-26 R17me2a	H3 7-26 R17me2s	H3 7-26 K18ac	100 ng
D	H3 1-19 K9ac	H3 1-19 K9me1	H3 1-19 K9me2	H3 1-19 K9me3	H3 1-19 S10P	H3 1-19 T11P	H3 7-26 unmod	H3 7-26 K14ac	H3 7-26 R17me1	H3 7-26 R17me2a	H3 7-26 R17me2s	H3 7-26 K18ac	10 ng
E	H3 16-34 unmod	H3 16-34 K23ac	H3 16-34 K27ac	H3 16-34 K27me1	H3 16-34 K27me2	H3 16-34 K27me3	H3 16-34 R26me1	H3 16-34 R26me2a	H3 16-34 R26me2s	H3 16-34 S28P	H3 26-44 unmod	H3 26-44 K36ac	100 ng
F	H3 16-34 unmod	H3 16-34 K23ac	H3 16-34 K27ac	H3 16-34 K27me1	H3 16-34 K27me2	H3 16-34 K27me3	H3 16-34 R26me1	H3 16-34 R26me2a	H3 16-34 R26me2s	H3 16-34 S28P	H3 26-44 unmod	H3 26-44 K36ac	10 ng
G	H3 26-44 K36me1	H3 26-44 K36me2	H3 26-44 K36me3	H3 26-44 Y41P	H3 47-65 unmod	H3 47-65 K56ac	H3 71-89 unmod	H3 71-89 K79me1	H3 71-89 K79me2	H3 71-89 K79me3	Rat IgG 10 ng	Sheep IgG 10 ng	100 ng
H	H3 26-44 K36me1	H3 26-44 K36me2	H3 26-44 K36me3	H3 26-44 Y41P	H3 47-65 unmod	H3 47-65 K56ac	H3 71-89 unmod	H3 71-89 K79me1	H3 71-89 K79me2	H3 71-89 K79me3	Mouse IgG 10 ng	Rabbit IgG 10 ng	10 ng

图10：利用默克密理博的AbSurance™ 组蛋白H3抗体特异性芯片（货号 16-667）进行特异性筛查。

此抗体检测到三甲基组蛋白H3（Lys4）（绿色），同时也确认了之前多肽抑制分析的数据，与二甲基组蛋白H3（Lys4）（红色）的亲和力低，交叉反应性弱。（阳性对照IgG显示在12H的位置，呈蓝色）。

3.2.4. 验证检测

在理想情况下，抗体经过ChIP的验证。然而，缺乏ChIP数据也不一定表明此抗体不适用于ChIP。在选择ChIP研究的抗体时，考虑此抗体现有的所有应用数据，因为可应用实验越多，抗体应用于ChIP的可能性就越大。例如，一个抗体经过免疫沉淀（IP）、免疫荧光（IF）或免疫组化（IHC）的验证，则与只经过Western blot验证的抗体相比，更有可能产生阳性的ChIP结果。然而，这些应用的验证并不保证抗体在ChIP中的成功，因为成功的ChIP抗体必须识别可接近的表位，而不受ChIP中经常使用的交联方法的影响。

► ChIP提示

- 选择在免疫细胞化学、Western blot，和/或免疫沉淀中成功使用的候选ChIP抗体。在其他免疫分析中的满意表现增加了ChIP成功的可能性。尽管这并不保证ChIP中的表现，但它有助于优先选择候选抗体，并淘汰那些不太理想的抗体。

► 示例

ChIP的抗体验证：Anti-JMJD6 (ChIPAb+™ 货号 17-10263)

利用默克密理博的Anti-JMJD6（货号09-812）收集免疫荧光和Westernblot数据。利用ChIPAb+™ JMJD6抗体/引物套装（货号17-10263）以及Magna ChIP™ A Kit（货号 17-408）获取ChIP数据。

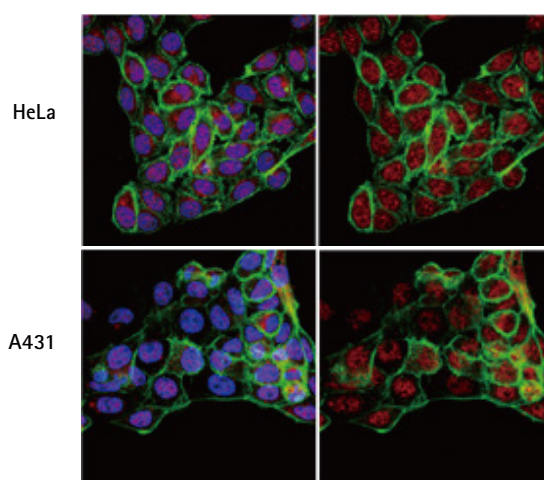


图11：免疫荧光分析表明，Anti-JMJD6识别细胞中天然构象的表位。

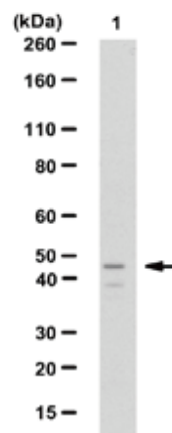


图12：Western blot分析证实，Anti-JMJD6让JMJD6蛋白免疫沉淀。结合DNA的富集倍数。

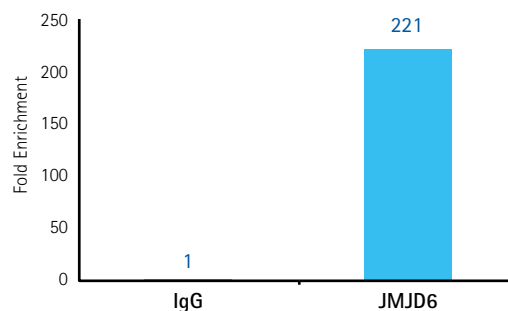


图13：随后ChIP中的JMJD6检测表明JMJD6结合DNA的富集倍数。

3.2.5. ChIP抗体的应用

ChIP抗体可直接与琼脂糖或磁珠相结合，也可固定在蛋白A和/或蛋白G结合的磁珠上。最早的ChIP操作使用琼脂糖珠，但许多ChIP的长期用户已转移到磁珠。磁珠能够从粗制的染色质混合物中快速分离蛋白质/DNA复合物，此过程使用磁性分离装置，如MagnaGrIP™ Rack（货号20-400）、PureProteome™ Magnetic Stand（货号LSKMAGS08或LSKMAGS15），或MagnaGrIP™ HT96 Rack（货号17-10071）。

琼脂糖珠在许多研究人员的手中表现不错，是个更便宜、但更耗时的选择。这些珠子需要离心分离，可能表现出非特异结合，这可能需要封闭和裂解液预澄清。

默克密理博提供琼脂糖和磁珠，以及ChIP试剂盒（详见第7页）。我们的试剂盒和微珠是以各种形式提供的，包括蛋白A、蛋白G，以及蛋白A和G的混合物（蛋白A/G）。微珠类型的选择通常受到实验中计划使用的抗体类型的影响。

Magnetic Beads

Advantages
Low nonspecific binding
Blocking and preclearing not required
Easy to handle during washes
Beads are visible in tube
Reproducible results
Disadvantages
Slightly higher cost
Magnetic rack required
Non-porous (binding capacity dependent on bead surface area)

Agarose Beads

Advantages
High capacity binding (porous), which may also increase nonspecific binding
Simple equipment required (centrifugation or filtration)
Slightly lower cost
Disadvantages
Blocking required
Preclearing required
Not visible in tubes
High probability of bead loss during handling

蛋白A微珠与兔多克隆抗体表现出最高的亲和力，而蛋白G微珠与更广范围的抗体结合，包括大多数但并非全部种类的小鼠单克隆IgG。蛋白A/G混合物就抗体类型而言提供了最大的灵活性，因为它综合了蛋白A和蛋白G的结合特性。我们的研发团队发现，蛋白A/G混合物通常比单独使用蛋白A或G产生的背景更低，适用于广泛的抗体，而不损害pull down的效率（详见图14）。

▶ 示例

蛋白A/G微珠：17-646 ChIPAb+™ Hp1g（CBX3）蛋白G纯化的小鼠单克隆

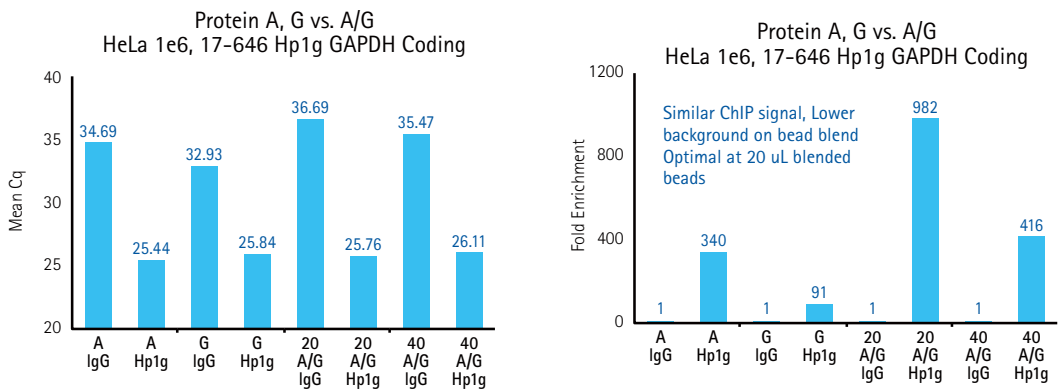


图14：单独使用蛋白A或G与使用A/G混合物的ChIP比较。与较低的背景信号一致，与单独使用蛋白A或G微珠相比，蛋白A/G混合物较晚检测到IgG信号（Cq更高）（左图）。此外，使用蛋白A/G混合物与单独使用蛋白A或G的Cq相似，表明无信号损失。较低的背景和相似的信号回收表明蛋白A/G混合物的富集倍数更高，如右图所示。

无论您选择哪种微珠，您在ChIP反应中使用磁珠或琼脂糖珠的顺序可能影响您的ChIP信号。一种方法是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，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。另一种方法是将抗体与染色质共同孵育，再加入微珠，或同时加入这三个组分。加入三个组分通常奏效，能减少开展整个反应所需的时间。

磁珠
蛋白A/G磁珠

Description	Catalogue No.
Magna ChIP™ Protein A+G Magnetic Beads	16-663
Magna ChIP™ Protein G Magnetic Beads	16-662
Magna ChIP™ Protein A Magnetic Beads	16-661

关于ChIP附件的完整列表，请访问：
www.merckmilipore.com/epigenetics

磁力架



PureProteome™ Magnetic Stand
(货号 LSKMAGS08)

高效的磁珠捕获：强大的梯形磁铁配合EP管的轮廓，能捕获高达300 μL的磁珠
高效的搅拌：可移动的磁铁和独特的涡旋振荡器接口实现了充分的混合
容易操作：符合人体工程学设计的磁力架牢固地握住1.5 mL和2.0 mL管

Magna GriP™ Rack
(货号 20-400)

高效的磁珠捕获：聚乙烯磁力架包含4个钕磁铁
通用：磁力架也可用于任何15 mL或0.5 mL管
容易操作：符合人体工程学设计的磁力架有8个孔，适合1.5 - 2.0 mL管或离心柱

3.2.6. 清洗免疫沉淀物

在免疫沉淀之后，抗体、磁珠以及蛋白A或G的表面常常结合有生物分子，但与抗原识别不相关。因此，必须用ChIP特异的缓冲液开展一系列洗涤步骤，以便从您的免疫沉淀物中去除非特异性的染色质、蛋白质和核酸，因为这些非特异性的组分可能明显增加背景信号，产生高的可变性，并导致ChIP分析的失败。在某些情况下，我们可使用多个缓冲液（例如高盐、低盐、氯化锂和严格的TE洗涤），或严格性渐增的缓冲液，来减少非特异性分子的结合。其他方案则包括较为简单的缓冲液体系。无论您使用哪种洗涤方法，您应使用一致的洗涤条件：维持一致的缓冲液温度、洗涤孵育时间，和洗涤时所用设备的旋转速度。在某些情况下，增加洗涤次数可能会降低背景信号，不过ChIP信号的明显改善最终是由您ChIP抗体的质量和ChIP靶点的性质决定的。

3.3. 洗脱和解交联

洗脱和解交联步骤是必要的，可将您的染色质复合物与抗体和磁珠解离，并将ChIP的DNA与染色质复合物的蛋白质部分分离。如果您使用磁珠，利用磁力架和适当的洗脱缓冲液（如碳酸钠缓冲液）可轻松完成洗脱。利用多肽竞争分析也能完成洗脱，其中抗体/蛋白质/DNA复合物与肽段一起孵育，此肽段与抗体的亲和力比您的蛋白质靶点更大，使得抗体复合物中的蛋白质靶点被替换。这种方法能够显著降低背景信号，但也比较昂贵，因为合成肽段的成本较高。

在用碳酸钠等试剂洗脱后，并且在qPCR分析之前，您必须逆转赖氨酸残基和DNA之间的甲醛交联。通常用蛋白酶K（Cat# 539480-100mg）孵育和加热的方式进行交联逆转。

您需要进一步纯化DNA样品，利用有机溶剂的组合（如苯酚:氯仿提取，详见补充操作）来提取DNA。或者，通过硅胶膜（即离心柱）、磁性DNA纯化粒子，或螯合剂（如Chelex®）从消化的蛋白质/核酸混合物中纯化DNA。我们建议您在蛋白酶K消化之前开展RNase消化步骤，以便从ChIP反应中去除污染的RNA。

3.4. 实时定量PCR (qPCR)

在您完成ChIP并纯化您的DNA样品之后，您可选择开展终点或实时定量PCR (qPCR)，以定量您样品中的DNA。在qPCR中，您的DNA样品与引物、聚合酶、寡核苷酸及检测荧光基团，如TaqMan®（荧光报告基团:淬灭基团杂合体）特异探针或SYBR® Green嵌入染料（无需特异探针）共同孵育。DNA样品通过DNA聚合酶经历数个扩增循环，其中上个循环的产物成为下个循环的模板，因此在最理想的反应中，扩增的DNA在每个循环中倍增。qPCR分析让您能够通过分析与扩增子的量成正比的荧光信号强度，实时定量多个样品中的起始DNA浓度。为了实现成功的ChIP分析，确保您的引物能以95%以上的效率扩增目的序列，且它们不会形成二聚体，这些二聚体有可能减弱基于SYBR® Green技术的qPCR的特异信号。

► ChIP提示

- 在开始qPCR之前，您必须通过蛋白酶K和加热来逆转您的起始和待测样品的交联（详见前文）。在某些情况下，您可能需要开展有机溶剂（苯酚:氯仿）提取来纯化您的DNA。

为获得最高的重复性和信噪比，开展qPCR的最佳实践可在以下地址找到：

<http://bitesizebio.com/articles/10-tips-for-consistent-real-time-pcr-rt-pcr/>

两种常用的qPCR检测方法是SYBR® Green技术和TaqMan® 探针技术。SYBR® Green是一种DNA结合染料，在与双链DNA结合时荧光显著增强。因此，当双链DNA的拷贝数增加时，荧光信号也增加。检测也可通过TaqMan® 探针来实现。在这种方法中，荧光报告基团和荧光淬灭基团被掺入单个序列特异的探针中，此探针能识别您的PCR扩增子。对于游离的探针，报告基团的信号因淬灭基团的邻近而淬灭。一旦与扩增子杂交，DNA聚合酶的5'→3'核酸外切酶活性将降解探针，释放出与可杂交的模板分子的数量成正比的游离荧光基团。在上述两种qPCR技术中，荧光信号都先经历线性期，而在反应中的一个组分成为限速时到达平台期。

SYBR® Green和TaqMan® 检测方法的比较

	SYBR® Green	TaqMan®
检测	检测双链DNA	通过探针的杂交和降解检测扩增子
通量	单个目标	可多重分析
技术挑战	低；简单的实验操作	有点高；需要精心设计的引物和探针以及每个引物/探针组合的优化
成本	+	++
特异性	+ 可能检测非特异信号，如引物二聚体或其他不感兴趣的核酸分子	++ 非特异性结合低

荧光信号指示每个样品的循环阈值 (Ct)*。Ct值指的是线性期中荧光信号超过背景的点。Ct取决于您样品中DNA的量。如果您的样品含有相对大量的DNA靶点，则需要较少循环就能超过背景，那么Ct值较低。相反，如果您的DNA靶点量较低，则实现Ct需要更多的循环。通过qPCR开展ChIP分析时，最好使用更稀的DNA样品（而不是高度浓缩的模板，因为高浓度存在时，它可能会抑制Taq聚合酶）。因此，按照现有方案中通过qPCR分析ChIP DNA的典型量，如50 µL ChIP样品中取2 µL，以避免向反应中引入PCR抑制剂。

*注意：目前的MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-TimePCR Experiments) 指南建议在报告qPCR数据时，应以“定量循环” (Cq) 来取代“循环阈值” (Ct)。关于此主题的更多信息，以及适当的运行对照、数据分析标准和错误报告的建议，请访问<http://www.rdml.org/miqe.php>。

3.4.1. qPCR反应的效率

为了从您的qPCR分析中提取出有意义的信息，您必须测定某些参数，以确保分析本身是正常工作的。首先，检测您qPCR反应的效率（E）。qPCR反应的效率通常以百分比表示，这表示每个循环中被扩增模板的百分比。检测您反应效率的最佳方法是建立标准曲线，通过运行已知浓度样品的五点连续稀释，并将相应的Ct值作图以建立标准曲线。

对于qPCR优化实验中所用的DNA标准品，您可以使用片段化、已纯化的基因组DNA，或更方便的是，使用分离自染色质、作为起始样品的DNA。这个起始样品在您的总染色质样品中占很小的比例（2-5%）。染色质样品应经过蛋白酶K消化，解交联，并经过纯化，以便为分析开发或效率计算提供一个适当的对照材料。在qPCR仪器的软件中，如果您的样品类型选为“标准”，效率通常是自动计算并报告的。

反应效率可通过以下公式来计算：

$$\text{Efficiency (E)} = 10^{-1/\text{标准曲线的斜率}}$$

$$\% \text{ Efficiency} = (E-1) \times 100$$

对于一个精心优化的反应，效率应介于95-105%。如果您的效率落在此范围之外，您可能需要探究实验中可能的误差来源：

1. 运行每个稀释度的至少三次重复，并调整您的稀释度
2. 使用经过优化的缓冲液
 - a. 如果可能，使用商业化的预混液，以实现更加一致的结果。
 - b. 运行一个不包含DNA的样品，以检测您的缓冲液是否有污染。
3. 使用精心设计的引物 - Ct值最好在18-30之间。
4. 如果您的效率仍不是最佳，考虑下列可能的原因：
 - a. 扩增子太大（使其长度保持在65-150 bp）
 - b. 引物完整性差（使用新鲜的引物）
 - c. 引物浓度太高（改变引物稀释度以避免二聚体）
 - d. 模板DNA中存在苯酚、盐或乙醇的污染
 - e. 仪器的基线或阈值设置不当
 - f. 无模板对照的污染（使用专门的移液器、UV照射过的仪器、新鲜的Milli-Q® 纯水等，在单独的空间建立反应）

3.4.2. 数据分析

目前有两种分析qPCR数据的方法：绝对定量和相对定量。

绝对定量

绝对定量能确定特定数量的样品中有多少DNA，而不需要与其他样品进行比较分析。对于这种分析，您应当开展以下操作：

1. 准备已知浓度样品（已定量、已纯化的起始DNA）的连续稀释
2. 每个稀释度至少包括三次重复
与您的待测样品一起运行这些标准品
3. 将样品的log值与qPCR分析所获得的Ct值作图，建立标准曲线
4. 开展回归分析，以确定标准曲线的方程，并利用此方程来计算未知样品的DNA量

待测样品中DNA目标的量应落在qPCR分析的线性动态范围。如果情况并非如此，须调整标准样品的稀释度，并重复实验。

根据外推Ct测定所得到的拟合值可报告为“回收的DNA纳克值”、“起始百分比”、“拷贝数”、“平均量”，以及描述分子数量的其他变型。在使用起始DNA作为相对标准曲线法的标准品时，“起始百分比”最为常用。

相对定量

在相对定量分析中，待测样品是以相对于对照样品（利用纯化的正常IgG免疫沉淀或mock IP）的倍数变化来表示的。待测样品也可表示为参考基因的百分比，此基因已知在实验条件下维持恒定的表达水平，类似于Western blot分析中的“看家”蛋白质，或qRT-PCR表达分析中的看家基因cDNA。已知未被免疫沉淀蛋白质占据的DNA位点（阴性位点）可作为这种方式中的参考基因，相对于已知、被占据的阳性对照DNA位点。

相对定量采用 ΔCt 或 $\Delta\Delta Ct$ 方法。这些方法假定您的PCR反应的扩增效率是100%（例如，在反应的线性期，扩增子在每个循环倍增，且 $E = 2$ ），或至少是，检测中的所有分析有着相同的效率。

ΔCt 方法

当利用相同数量的细胞来获得对照和待测DNA样品时，可使用 ΔCt 方法。

其中 $E=2$:

$$\text{ChIP DNA/对照DNA的比例} = 2^{Ct(\text{control DNA}) - Ct(\text{ChIP DNA})}$$

2- $\Delta\Delta Ct$ 方法

这种方法被广泛用于以起始DNA来标准化ChIP DNA，分析包括阳性和阴性位点的引物，且扩增效率相同。起始DNA指的是在免疫沉淀之前获得的染色质样品。ChIP DNA和稀释的起始DNA同时分析，以产生各自的Ct值。为了计算ChIP DNA相对于起始样品的富集倍数，完成下列步骤：

1. 对于每对引物，用ChIP DNA的Ct值减去起始DNA所获得的Ct值，以起始DNA的Ct值来标准化ChIP DNA的Ct值（ ΔCt ）：
 $\Delta Ct = Ct_{\text{ChIP DNA}} - (Ct_{\text{input}} - \log_2 [\text{Input dilution factor}])$
2. 计算每个ChIP的起始百分比：
 $\% \text{Input} = 2^{-(\Delta Ct [\text{normalized ChIP}])}$
3. 用阳性位点的 ΔCt 值减去阴性位点的 ΔCt 值，以阴性位点来标准化阳性位点的 ΔCt 值（ $\Delta\Delta Ct$ ）：
 $(\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{positive}} - \Delta Ct_{\text{negative}})$
计算ChIP DNA中阳性位点序列相对阴性位点的富集
4. 集倍数：
 $\text{Fold enrichment} = 2^{\Delta\Delta Ct}$

参考文献

1. Kuo, M.H., et al. Methods 1999; 3:425-433.
2. Zhang, L., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004 ; 322: 705-711.
3. Livak, K.J., et al. Methods 2001; 25(4):402-428.
4. Schmittgen, T.D., et al. Nat Protoc. 2008; 3(6):1101-1108.
5. Das, P.M., et al. Biotechniques. 2004 ; 37(6):961-969.
6. Collas, P. Methods Mol Biol. 2009; 567:1-25.
7. Turner, F.B., et al. Methods Mol Biol. 2006; 325:261-272.
8. Weinmann, A.S., et al. Methods. 2002; 26(1):37-47.
9. Nègre, N., et al. Methods Enzymol. 2006; 410:316-341.
10. Wells, J., et al. Methods. 2002; 26(1):48-56.
11. Sambrook, J., et al. Cold Spring Harb Protoc; 2006; doi:10.1101/pdb.prot4455.
12. Sambrook, J., et al. Cold Spring Harb Protoc.2006; doi:10.1101/pdb.prot4456.
13. Latham, J.A., et al. Nat Struct Mol Biol. 2007; 14(11):1017-1024.

常见问题及问题解决

问题/提问	建议的步骤/答案
阴性对照（IgG或mock IP）样品的背景高	过量抗体导致非靶点的结合：优化抗体的浓度。
	与微珠的非特异结合：采用预纯化步骤，以排除这些非靶点，或加入微珠的封闭剂。
	染色质的不完全断裂：优化断裂过程，以获得长度在200-1000 bp的染色质。单独优化每种细胞或组织类型的断裂。使用硅处理或低吸附的管子。
	试剂被污染：确保所有试剂都是新鲜制备，不含污染。
	增加洗涤次数。
"无DNA"PCR反应也产生信号	运行一个"无DNA"的PCR反应，以确定您的样品是否被核酸污染。
	使用PCR专用的移液器，或在建立PCR反应前用紫外光照射移液器。
	在三个独立的空间/区域使用专门的移液器开展ChIP、DNA纯化和PCR反应建立，或在通风橱中建立反应。
	避免使用瓶装或其他预包装的水。
	使用新鲜制备的Milli-Q®水，来自带紫外光源的系统。
DNA回收率低	使用防气溶胶的吸头。
	请勿在未来ChIP或qPCR实验的区域附近打开含有已扩增PCR产物的管子。
	ChIP抗体失效或亲和力低：确保您正使用经过ChIP验证的抗体，特别是带有正负对照的ChIP Ab+抗体引物套装。关于ChIP抗体的完整选择，详见 www.merckmillipore.com/epigenetics 。如果您正使用ChIP抗体，增加抗体的孵育时间。
	ChIP抗体不够：通常1-10 µg ChIP抗体是足够的。不过，所需的抗体量可能取决于您的蛋白质靶点的相对丰度和抗体与靶点的亲和力。
	起始样品不够：在交联之前，准备一块单独的板以确定细胞数量。每次反应时重新评估细胞数量。增加您的细胞数量，特别是如果您试图检测低丰度的靶点。
过度交联：甲醛的长时间孵育可能遮蔽ChIP抗体识别所需的表位。如果您使用单克隆抗体，这个问题更突出。过度交联也可能导致复合物的形成，它们耐受超声处理。优化交联步骤：甲醛的终浓度应为1%，您应当在继续实验之前确定最有效的交联时间。	细胞裂解不完全和断裂低效：改变参数（详见5.3）并评估它们对染色质回收的影响，优化这些步骤。使用机械力如杜恩斯匀浆器或玻璃珠来改善细胞裂解。优化断裂步骤，避免起泡。
	交联不足：不充分的交联可能导致蛋白质靶点在后续操作中与DNA解离。除非您研究组蛋白和组蛋白修饰，否则您应使用X-ChIP方案，以稳定蛋白质靶点与DNA的结合。增加交联时间。
	低亲和力或低质量的磁珠：蛋白G磁珠（16-662）与更广泛范围的抗体结合，包括小鼠单克隆抗体。为了抗体选择的最大灵活性，我们建议用蛋白A/G混合物（货号 16-663）。
	PCR引物：检验引物的效率。包括合适的对照，如果必要，重新设计引物。
	我应该使用单克隆还是多克隆抗体？
我应该如何提高所选抗体在ChIP中发挥作用的机会？	单克隆或多克隆抗体都适用于ChIP。单克隆抗体通常高度特异，但对交联条件敏感。过度交联可能遮蔽目标表位，需要精心优化交联。多克隆抗体对过度交联条件没那么敏感，可能比相应的单克隆实现更好的富集，但它更有可能与非特异的靶点结合。
	我应该如何选择商业化的ChIP抗体？
我应该使用多少抗体？	我们建议您使用2-10 µg ChIP抗体，这取决于您的蛋白质靶点的丰度和抗体与靶点的亲和力。更多抗体不一定产生更强的信号。建议滴定抗体的量，以获得最佳的ChIP信号。
	我应该如何选择商业化的ChIP抗体？
我应该如何选择商业化的ChIP抗体？	选择一个通过多项特异性/交叉反应性检测，并在ChIP和多个免疫分析中验证过的抗体。
	关于组蛋白抗体的选，我们建议使用AbSurance™ 组蛋白抗体特异性芯片（货号 16-665、16-667和16-668）

问题/提问	建议的步骤/答案
如果我无法找到合适的ChIP抗体，您是否建议使用标签	在ChIP中使用标签抗体是一种解决抗体无法获得、抗体可变性和交联染色质的表位被遮蔽的方法。不过标签有可能干扰转录因子的功能。这应当具体问题具体分析。将标签从N端转换到C端可能是很好的对照。
如果我想过表达一个带融合标签的蛋白质，我应当考虑哪些因素？	任何发生过表达的系统都可能引入假阳性的相互作用。理想情况下，如果您正在分析带融合标签的稳定表达细胞系，我们建议您使用高表达和低表达的细胞系，并对未转染细胞的染色质开展mock IP，作为对照比较。
什么是好的对照抗体？	我们建议使用与您的ChIP抗体相同物种的正常IgG，因此如果您使用小鼠单克隆抗体，我们建议使用正常小鼠IgG。
使用蛋白A/G混合物有何好处？	许多抗体以不同的亲和力和特异性与蛋白A（16-661）和G（16-662）结合。混合蛋白A和G的磁珠就避免了选择其中一类，并评估抗体与其结合能力。在大多数情况下，与使用相似量的纯蛋白A或蛋白G磁珠相比，我们发现使用蛋白A/G磁珠（16-663）能获得更好的富集倍数和较低的背景。
染色质反复冻融是否会影影响我的ChIP结果？	在处理染色质样品时，我们不建议反复冻融，但在某些情况下，这不会影响ChIP的结果。这可能取决于保存染色质的缓冲液。在某些操作中，缓冲液中包含甘油，可以避免反复冻融引起的染色质降解。
为什么在免疫沉淀之前需要大量的ChIP稀释缓冲液？不同的微珠是否需要不同的缓冲液？	当染色质破碎所使用的裂解缓冲液包含高浓度的SDS（某些情况下是1%）时，需要对染色质进行十倍稀释。稀释染色质能确保IP微珠和抗体不会被变性或因去污剂存在而受影响。在我们的ChIP试剂盒中，琼脂糖珠和磁珠使用相似的缓冲液。
您如何确定是否过度交联了样品？	如果您之前不曾ChIP中研究过这个靶点，我们建议您用1%的甲醛处理培养的细胞，室温下10分钟。如果您未能获得富集（并预计蛋白质存在于您寻找的位置），将交联时间延长至15或20分钟。如果您过度交联，您一般会以不依赖位置的方式看到相同的信号。不依赖位置意味着您在已知的结合位点vs.已知的阴性位点（如4 kb远的位点）观察到相同的信号。
为什么我无法让靶点与DNA交联？	您的交联时间可能不够。延长交联时间。
是否有必要淬灭交联步骤？	淬灭通常是通过添加甘氨酸来完成的。不过，一些方案也表明，（在固定培养细胞时）用PBS来洗涤甲醛足以停止交联。这将取决于在您固定细胞时，培养基中是否存在血清。如果血清蛋白存在于培养基中，甘氨酸淬灭将更重要。
在琼脂糖凝胶电泳之前是否有必要解交联，并提取ChIP DNA？	在开展此步骤之前，强烈建议解交联。大的复合物有可能阻塞凝胶的孔，延缓电泳，并产生高背景。DNA纯化是可选的，取决于您的样品。在经过蛋白酶K（539480-100mg）消化和解交联后，粗制的DNA可能成功扩增和染色。
我应当考虑使用非甲醛交联剂吗？	这将取决于您的特定样品。在某些情况下，建议使用双重交联剂。有时可使用紫外交联，但紫外交联是不可逆转的，将妨碍ChIP DNA的进一步分析。
细胞核分离是必需的吗？	在提取染色质之前分离细胞核可去除胞质蛋白，从而降低背景。
我如何判断我是否从细胞中分离了细胞核？	您可以在相差显微镜下观察样品，以确定细胞核是否从细胞中释放。
对于那些与DNA间接结合的辅助因子，应当使用多少细胞？	建议使用1000万个细胞。请参见“染色质制备”，了解进一步的指引。
我应当如何利用组织来开展ChIP实验？	一般而言，染色质可从新鲜或冷冻的组织制备，并在含有1%甲醛的溶液中固定15分钟，但如何做到这一点，以及在染色质分离之前如何破碎或匀浆组织，还是有许多变化。您可以尝试使用Magna ChIP G Tissue Kit（货号17-20000），以一种更为轻松的方法来处理您的组织样品。目前也有许多实验室发布了组织ChIP的操作方案，如加州大学戴维斯分校的Farnham实验室，以及一些已发表的脑组织方法。

问题/提问	建议的步骤/答案
在剪切染色质时，我应当开展酶切消化还是超声处理？	酶切消化可能不如超声处理高效，而在37°C孵育样品可能导致表位降解，但消化可能不需要超声处理那么多优化，就能实现单、二或三核小体。
超声处理的最佳仪器是什么？	这取决于您的特定样品。您可以使用任一类型的超声处理仪器，但必须针对每种类型的样品优化超声过程。
如果使用探头超声波仪，探头端应放在哪里？	探头端应浸没，但不触碰管壁。为了批量制备染色质，我们建议使用15 mL锥形管，其最小体积为0.6 mL（1.2 mL更加一致），并使用钳子来确保探头靠近底部但不触碰管壁。在超声处理过程中，管子本身应置于可调整的平台，浸没在冰浴中。
我一次能开展多少个ChIP反应？	目前有一些商业方法，能让您一次在96孔板中最多开展96个ChIP反应。对于高通量研究，我们建议您使用默克密理博的Magna ChIP™ HT96 ChIP Kit（货号 17-10077）或EZ-Magna ChIP™ HT96 Kit（货号 17-10078），其中包含对照。
我应当开展凝胶分析还是实时定量PCR（qPCR）？	我们建议开展qPCR，因为它不需要优化循环数，以确保您的分析处于对数扩增期。转录因子的富集可能较低，但qPCR让您能更加定量，而不是定性。
如何测定富集百分比？	一种方法是连续稀释起始DNA和对照样品ChIP实验富集的DNA，进行PCR反应。所获得的Ct值可用于绘制标准曲线，而待测样品可拟合到此曲线上，以确定富集百分比。（详见ChIP分析的qPCR部分）
我如何报告qPCR分析的误差（分析内或分析间的变化）？	重复开展所有qPCR，计算平均Ct和标准误差。然后，利用误差扩展计算器将标准误差放到整个富集计算中，如 http://laffers.net/tools/error-propagationcalculator/
是否建议在相对Ct法中仅以IgG来标准化待测样品？	比较分析的标准做法是使用mock IP、ChIP IP，以及目标扩增子和参考扩增子的起始量。仅仅利用mock IP（IgG）的Ct值作为标准而不需要其他样品是不可取的。
正常IgG对照抗体的可接受%起始范围是多少？	IgG pulldown变化很大，是依赖于qPCR分析的。基因组上一个位置与另一个位置的相同mock IgG样品可能有不同的起始百分比结果，这基于分析设计的序列组成。信号可能是核酸与管、与磁珠、与抗体非特异结合的结果。ChIP是相对的，因此最好不要固守特定的起始百分比，而在理想情况下，IgG的Ct值应当与您标准曲线上最稀的样品最接近。同样，ChIP是相对的，因此如果您的ChIP信号高于您的IgG信号（在分析的变化范围内），您就有了阳性的ChIP结果。
什么被认为是ChIP DNA的良好富集倍数？	这将取决于您的蛋白质靶点。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，您最好将您的结果与已发表的结果进行比较，而不是固守设定值。
我如何检验我的qPCR引物？	您可以对连续稀释的已知浓度样品开展qPCR反应，来检验您的引物。如果您的引物最佳地工作，而反应的其他所有条件都得到满足，您会在循环的每个线性期观察到扩增子的近乎倍增（详见qPCR部分）。
我应当开展单重还是多重qPCR分析？	在检测多个样品时，多重qPCR实验可能更适合，但需要更复杂的检测方法，如带荧光基团的探针，才能让反应管中的每个靶点DNA产生不同的荧光信号。因此，您需要对每个引物-探针组合进行优化，这可能产生额外的费用。单重实验很容易设计，而多个样品可同时运行，利用经济的DNA结合染料如SYBR® Green和适当设计的引物（详见qPCR部分）。
我如何区分核酸污染和SYBR® Green的非特异结合？	您可以开展熔解曲线分析，其中您控制qPCR过程的加热条件，让您的扩增子溶解。在目标扩增子的熔解曲线中，您应当只观察到一个峰。其他峰则表明存在引物二聚体或污染。

5.1. 制备ChIP用的细胞

1. 如有必要，在含有20 mL生长培养基的150 mm培养皿中刺激或处理贴壁的哺乳动物细胞（汇合度在80-90%）。多准备一板细胞，仅用于细胞数量的估计。
2. 每个150 mm培养皿准备22 mL 1X PBS（2.2 mL 10X PBS和19.8 mL水）。保存在冰上。这将用于洗涤，需要冰预冷。
3. 向20 mL生长培养基中直接加入550 μ L 37%的甲醛（或1100 μ L 18.5%的甲醛），进行交联。轻轻旋转培养皿进行混合。
4. 在室温下孵育10分钟。
5. 孵育期间，准备1X蛋白酶抑制剂：将培养皿中的细胞收集在管中加入2 mL预冷的1X PBS，并加入10 μ L 200X蛋白酶抑制剂混合物III。保存在冰上。
6. 向每个培养皿中加入2 mL 10X甘氨酸，以淬灭过量的甲醛。
7. 轻轻旋转混合，在室温下孵育5分钟。
8. 将培养皿置于冰上。
9. 吸去培养基，去除尽可能多的培养基，小心不要扰动细胞。如果您使用悬浮细胞，以800 x g离心5分钟。
10. 加入10 mL预冷的1X PBS，洗涤细胞。吸去1X PBS。
11. 吸去1X PBS，重复洗涤。
12. 加入2 mL第5步中准备的1X蛋白酶抑制剂混合物III。
13. 将每个培养皿的细胞刮到一个单独的微量离心管中。
14. 在4°C以800 x g离心5分钟，沉淀细胞。

5.2. 制备ChIP用的组织

1. 按照需要分离未固定的新鲜组织。用刀片将豌豆大小的一块组织切成小块（大约1 mm或更小），以提高交联效率。或者，使用来自冷冻切片而非FFPE材料的一块组织，以获得感兴趣的样品（请参阅Magna ChIP™ G Tissue Kit的说明书，货号 17-20000）
2. 将组织称重，然后转移到50 mL管中，用冰预冷的1X PBS洗涤两次。
3. 在20 mL冰预冷的PBS中重悬组织，加入550 μ L 37%的甲醛（或1100 μ L 18.5%的甲醛），进行交联。轻轻旋转培养皿进行混合。
4. 在室温下孵育10分钟。
5. 期间，准备1X蛋白酶抑制剂：对于每个样品，在单独的管中加入2 mL冰预冷的1X PBS，并加入10 μ L 200X蛋白酶抑制剂混合物III。保存在冰上。
6. 加入2 mL 10X甘氨酸，以淬灭过量的甲醛。
7. 利用Dounce匀浆器匀浆组织数次。
8. 在4°C以800 x g离心5分钟，沉淀细胞。

5.3. 优化超声处理和分析DNA片段

将交联的DNA剪切成200-1000bp片段的最佳条件取决于细胞类型、细胞浓度和具体的超声处理仪器，包括功率设置、持续时间和脉冲次数。优化超声处理的方法可能包括下列：

- 改变每mL初始缓冲液中相应的细胞浓度，而超声处理参数不变。
- 选择一个固定的每mL缓冲液中相应的细胞浓度，改变超声处理的循环和/或功率设置。
- 两种方法组合。

以下操作介绍了A选项的优化，仅供参考。

- 如5.1所述制备细胞裂解液。改变裂解液体积，产生3种不同浓度的细胞裂解液，浓度范围从 5×10^6 ml至 5×10^7 ml。
- 继续下面的细胞裂解步骤。每个微量离心管应包含约500 μ L细胞裂解液。

细胞裂解缓冲液的体积	细胞密度	所需的细胞
500 μ L	5×10^6 /mL	2.5×10^6
500 μ L	2×10^7 /mL	1×10^7
500 μ L	5×10^7 /mL	2.5×10^7

- 确保样品始终置于冰上。超声处理产生热量，将使染色质变性。
- 在超声处理之前，从每种条件下取出相当于 1×10^5 个细胞，用于未剪切DNA的分析。
- 对于每种细胞浓度，以固定的循环数超声处理，并按照仪器制造商的指南设置循环之间的间隔。例如，使用Misonix 3000仪器和419号微型探头，使用6个15秒脉冲，每次脉冲之间间隔50秒，功率设为6。始终保持管子冷却。
- 从每种条件的超声后染色质中取出相当于 1×10^5 个细胞（从最稀到最浓的样品依次为20 μ L、5 μ L、2 μ L），加入新的管中。
- 向所有样品（未剪切和剪切）中加入洗脱缓冲液至终体积为50 μ L。

- 加入1 μ L蛋白酶K，在62°C孵育2小时。
- 在1-2%琼脂糖凝胶中上样10 μ L和20 μ L，以及100 bp DNA marker。上样不同的量，以避免上样不足或过多。
- 观察哪种剪切条件能产生范围在200-1000 bp的DNA拖尾。
- 如果结果表明产生的DNA不在理想的范围，重复剪切条件的优化。一旦最佳条件确定，建议您在随后的染色质免疫沉淀实验中不要改变每个微量离心管的细胞浓度或裂解液体积。

5.4. DNA 纯化

（下列操作改编自Sambrook, et al., 2006。）

- 在室温下全速离心样品5分钟。
- 将上清转移至新的微量离心管中。
- 现在您能够利用离心柱纯化您的DNA。若用溶剂提取，继续第4步。
- 将核酸样品转移至聚丙烯管中，加入等量的苯酚:氯仿。如果苯酚未充分平衡至pH 7.8-8.0，则核酸将倾向于分开有机相。
- 混合管中的内容，直至乳液形成。
- 在室温下以管子能承受的最大速度的80%离心1分钟。如果有有机相和水相未很好地分离，则再次离心更长时间。
- 通常，水相在上层。不过，如果盐（>0.5 M）或蔗糖（>10%）使得水相密度高，则它会在下层。有机相比较容易鉴定，因为平衡期间加入到苯酚的8-羟基喹啉使其呈黄色。
- 使用移液器将水相转移至新的管中。若体积小（<200 μ L），使用装有一次性吸头的自动移液器。弃去交界面和有机相。
- 重复第1-4步，直至有机相和水相的交界面看不到任何蛋白质。
- 加入等量的氯仿，重复第2-4步。
- 通过标准的乙醇沉淀法回收核酸。

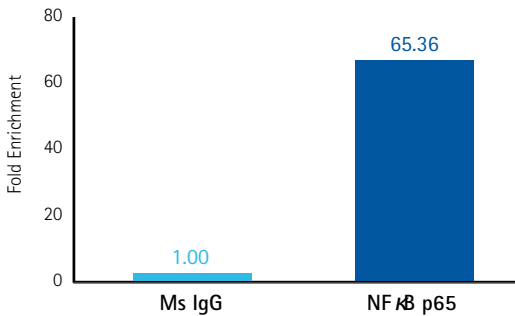
试剂盒及分析

一天的ChIP试剂盒

Magna ChIP™ A/G Chromatin Immunoprecipitation Kit
(货号 17-10085)

EZ-Magna ChIP™ A/G Chromatin Immunoprecipitation Kit
(货号 17-10086)

- 在一天内完成ChIP，从细胞到PCR结果
- 蛋白A/G磁珠混合物
- 更广泛抗体的富集
- 适合高通量应用
- 与native ChIP兼容
- EZ-Magna ChIP™试剂盒带有必要的阳性和阴性对照抗体，及qPCR引物



利用EZ-Magna ChIP™ 试剂盒，通过一天的ChIP确定NFκB结合的具体定位。从无血清的HEK293细胞、TNFα处理的HEK293细胞（每次IP相当于 3×10^6 个细胞）中制备超声处理的染色质，利用4 μg正常小鼠IgG或4 μg Anti-NFκB p65 (RelA) (NFκB p65 ChIPAb+™ kit (货号 17-10060) 包含的组分) 进行免疫沉淀。

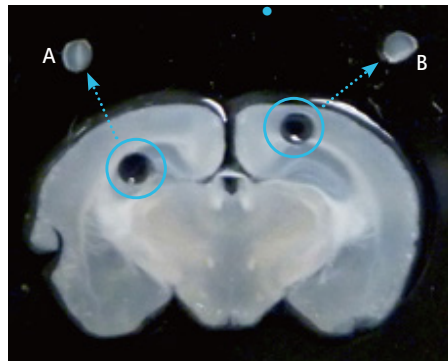
NFκB p65 (RelA) 结合的DNA片段的免疫沉淀是利用针对κBα的引物通过qPCR验证的。

组织ChIP

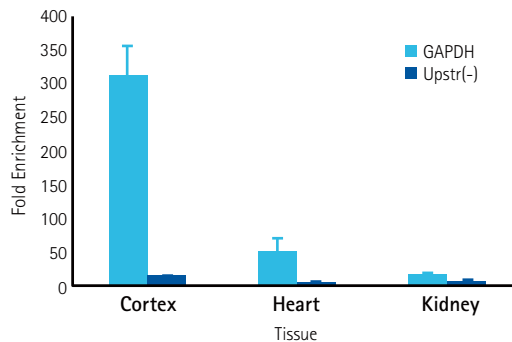
Magna ChIP™ G Tissue Kit
(货号 17-20000)

Magna ChIP™ G Tissue Kit为获得可重复、可靠且位点特异的组织活检提供了必要的工具。

- 各种组织样品的可靠ChIP
- 显微切割打孔器带来准确的组织活检
- 一整套优化的缓冲液
- 详细、优化的操作及指导的流程



区域特异的组织分离。我们利用试剂盒中提供的1 mm显微切割打孔器开展两次显微切割，获得300 μm的冠状小鼠大脑的冷冻切片。如图所示，分离出的组织放置在解剖区域的上方：(A) 海马，(B) 皮质。



RNA聚合酶II与GAPDH启动子的组织特异定位，利用Magna ChIP™ G Tissue Kit和Anti-RNA Polymerase II clone CTD4H8 (货号 05-623B) 发现的。我们利用1 μg抗体来免疫沉淀各种小鼠组织的染色质。之后利用小鼠GAPDH启动子特异的引物通过qPCR对免疫沉淀的DNA进行分析。利用qPCR来扩增免疫沉淀的染色质片段，数据以相对于独立实验中IgG相关DNA的富集倍数显示。富集倍数是利用Dhfr基因上游的引物 (UpStr (-)) 通过qPCR评估的。

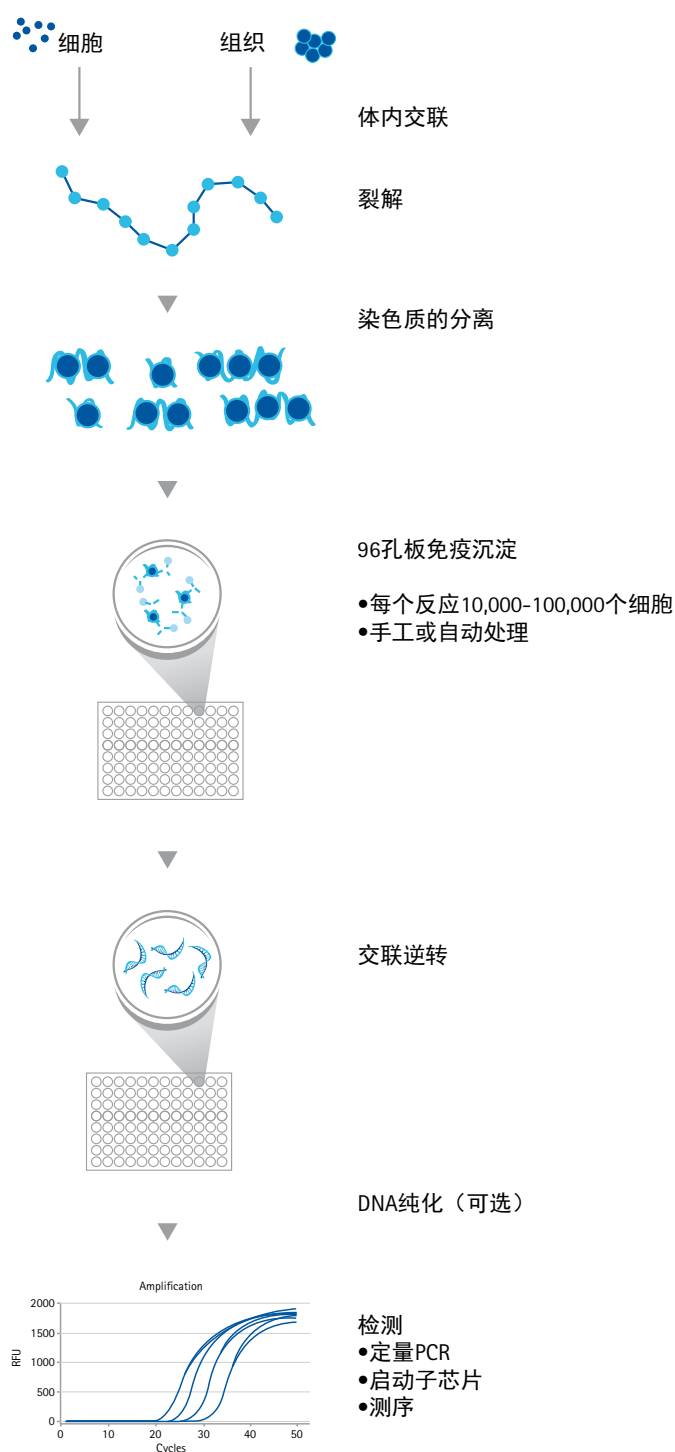
高通量ChIP试剂盒

Magna ChIP™ HT96 (货号 17-10077)

EZ-Magna ChIP™ HT96 (货号 17-10078)

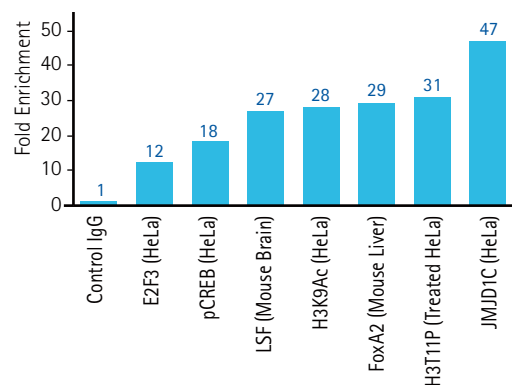
在单个实验中完成多达96个样品的ChIP。

Magna ChIP™ HT96系统是一个简单、高效、基于96孔板的ChIP方法，每孔仅需10,000个细胞。通过简化的操作和专利的缓冲液体系，Magna ChIP™ HT96试剂盒带来了出色的灵敏度以及比传统方法更低的背景。



特点与优势

- 一整套材料，适用于单块板上多达96个样品的ChIP
- 染色质需求量低：每个反应10,000-100,000个细胞
- 蛋白A/G磁珠混合物允许比单独的A或G使用更多种类的抗体亚型
- 优化、精简的操作允许在超声处理、IP和洗涤中使用一种缓冲液
- 直接分析得到的DNA，而无需额外的纯化步骤使用多通道移液器或标准的自动液体处理系统，获得高的富集倍数
- 使用细胞或组织的ChIP操作
- 提供包含或不含对照抗体和qPCR分析引物的选择
- 与ChIPAb+™ 抗体/引物对兼容



使用各种抗体和染色质类型的高通量ChIP。图中所示来源的染色质经过ChIPAb+™ 特异抗体（x轴）或IgG的免疫沉淀，使用Magna ChIP™ HT96多通道移液操作。分析是利用各个ChIPAb+™ 产品使用说明中介绍的条件开展的。

全基因组ChIP试剂盒

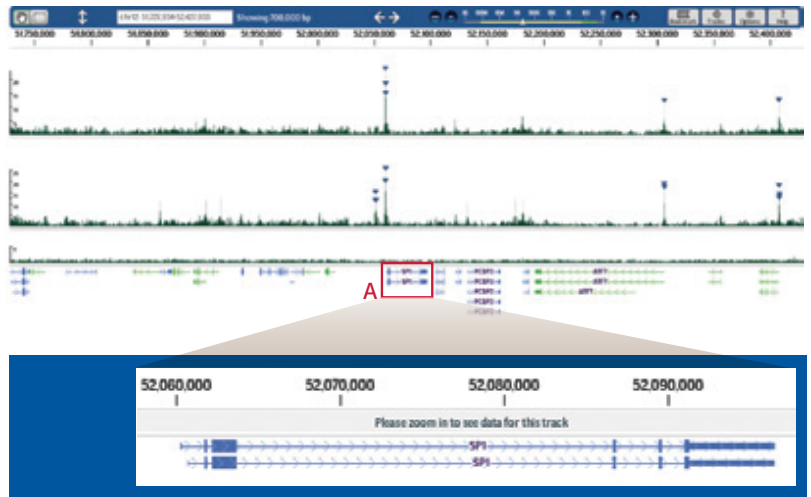
— 新一代测序

Magna ChIP™-Seq Chromatin Immunoprecipitation and Next-Generation Sequencing Library Preparation Kit

(货号 17-1010)

- 从低至1 ng纯化的ChIP DNA构建可靠的ChIP-Seq文库
- 蛋白A+G磁珠混合物与更大范围的抗体兼容
- 灵活的格式允许构建单端、双端或带条形码的文库
- 试剂足够用于10次新一代测序的文库构建
- 质量控制、经过验证的酶和缓冲液以方便的预混液提供，简化文库构建
- 包括经过验证的阳性和阴性对照抗体及对照引物对
- 通过在Illumina Genome Analyzer II在构建并测序基因组DNA文库而验证性能

利用Magna ChIP-Seq™ Kit制备的Sp1结合DNA文库的新一代测序分析



从数量有限的DNA构建新一代测序文库并实现高效的ChIP。利用Magna ChIP-Seq™ Kit (货号 17-1010) 和ChIPAb+™ Sp1 antibody/primer set (货号 17-601) 构建测序文库。利用1 ng、10 ng或起始染色质样品构建文库，并利用Illumina Genome Analyzer测序。通过DNAexus™软件浏览定位的reads，对Sp1位点进行峰值分析（利用序列标签的定量富集（QuEST）），表明Sp1结合（三角形）发生在预期的Sp1结合位点附近。

全基因组ChIP试剂盒 – 芯片分析

Magna ChIP2™ DNA Microarray Kits

Magna ChIP2™ 试剂盒是一种将您的ChIP分析扩大到全基因组的简单方法。这些试剂盒是第一个也是唯一一个完整的解决方案，通过结合所有必需和精心优化的试剂以及经过验证的操作和指南，标准化并简化了ChIP-chip分析。每个Magna ChIP2™试剂盒都旨在确保成功、灵敏度和重复性，使用的是安捷伦或用户提供的DNA芯片。

Magna ChIP2™ Universal Kits

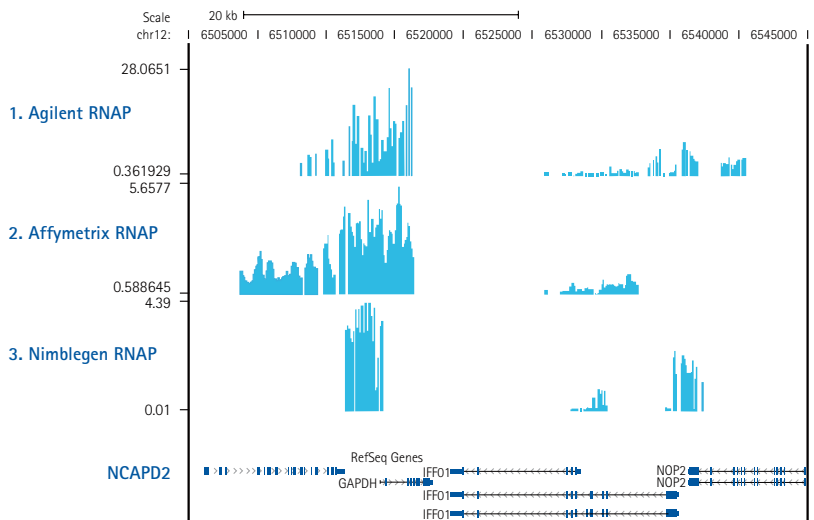
(货号 17-1000)

利用Magna ChIP2™试剂盒，在几乎任何类型的芯片上开展ChIP-chip分析。这些试剂盒包含优化的试剂和经过验证的方案，制备出可立即用于标记和杂交的染色质。

Magna ChIP2™ Human and Mouse Promoter Kits (货号 17-1001和17-1002)

简化的ChIP-chip分析，以久经考验的试剂和方案来进行分离、扩增、标记和杂交，包括您选择的任一种人类或小鼠的安捷伦启动子芯片。

利用Magna ChIP2™ Universal Kit对市售芯片的比较



Magna ChIP2™ 试剂盒能够在多种类型的芯片上开展全基因组范围的ChIP分析。利用默克密理博的Magna ChIP2™ 试剂盒对Agilent 244K promoter array (上)、Affymetrix® human promoter array (中) 和Nimblegen™ human promoter array (下) 的比较结果。

组蛋白芯片

Absurance™ 组蛋白H2、H3、H4 抗体特异性芯片

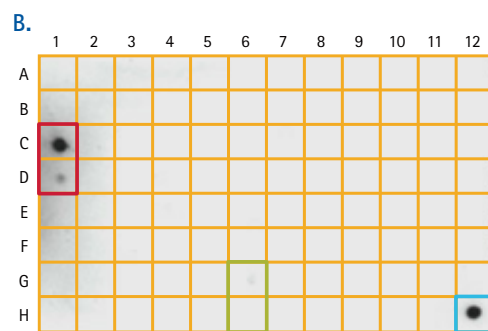
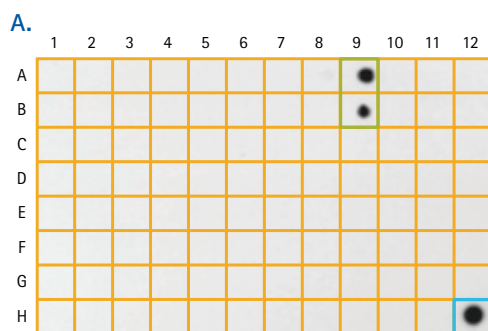
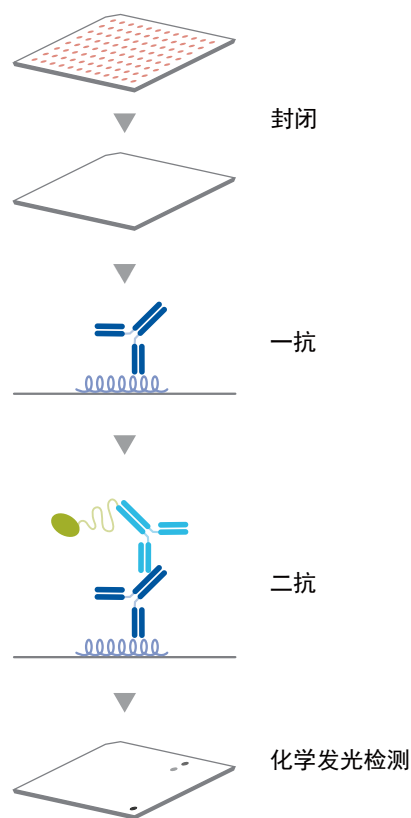
(货号 16-665、16-667和16-668)

利用筛选默克密理博高度特色且广泛发表的组蛋白抗体所用的多肽芯片技术，轻松评估您的组蛋白抗体的特异性和交叉反应性。Absurance™ 组蛋白抗体特异性芯片提供了一种类似Western blot的简单而高效的方法，来评估组蛋白H2A、H2B、H3和H4抗体的特异性和交叉反应性，而无需专门的成像设备或分析软件。

AbSurance™ 芯片的特点与好处：

- 高质量的纯化肽段（纯度高于95%）
- 总共89条肽段（21条乙酰化、43条甲基化、11条磷酸化和14条未修饰）
- 易于操作的PVDF膜
- 一致而均匀的肽段点样，使用专利的过程
- 利用胶片或CCD成像仪的灵敏化学发光检测
- 简单的数据分析 – 无需其他软件
- 内置大鼠、小鼠、山羊和兔的阳性对照一抗
- 目前提供单独的H3或H2A、H2B、H4芯片，或一整套直观、方便、类似Western blot的操作

Intuitive, convenient, Western blot-like protocol



Absurance™检测特异和非特异的相互作用。

A. 利用默克密理博针对三甲基化组蛋白H3赖氨酸4的抗体（货号05-745R）检测特异的相互作用。Absurance™芯片显示了H3K4me3肽段预期的特异性（9A和9B，绿色框），而与其他肽段无相互作用。一抗的稀释度为1:2,000。阳性对照兔IgG显示在12H（蓝色框）。

B. 利用供应商E针对乙酰化组蛋白H3赖氨酸56的抗体检测非特异的相互作用。Absurance™芯片数据表明目标肽段H3K56ac的识别弱（6G和6H，绿色框），而与H3K9ac有着强的交叉反应性（1C和1D，红色框）。一抗的稀释度为1:2,000。阳性对照兔IgG显示在12H（蓝色框）。

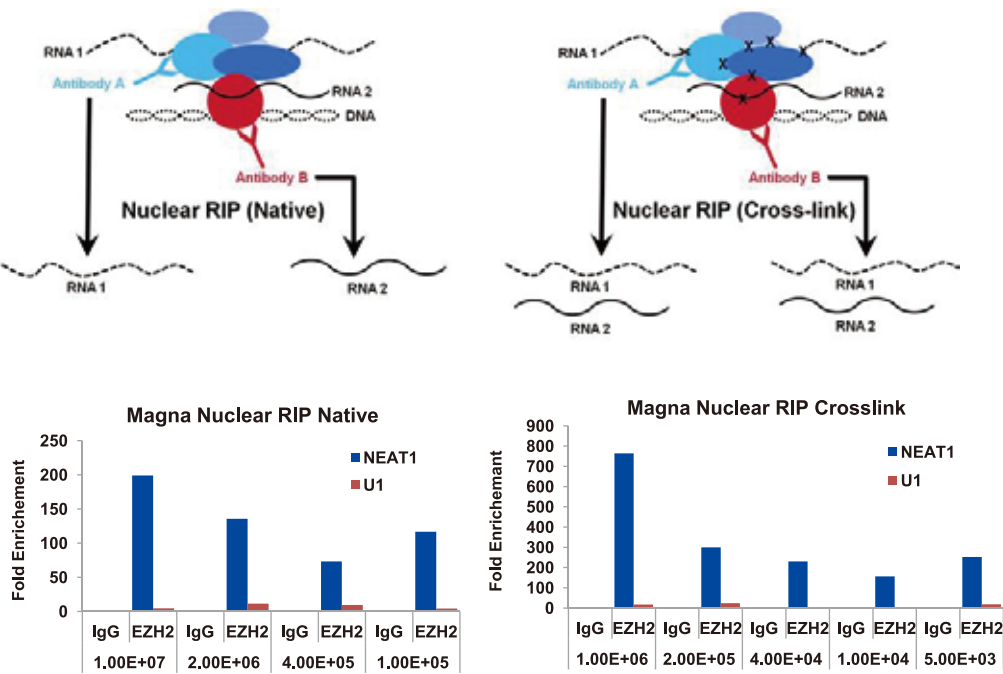
表观遗传学研究新产品

Magna Nuclear RIP™ Kit – 非编码RNA（lncRNA、enhancer RNA 、miRNA等）与蛋白相互作用创新技术

Magna Nuclear RIP™ Kit 配套完整试剂，用于研究细胞核内RNA与蛋白的相互作用，有助于研究非编码RNA的调控机制。

产品优势：

- 专为研究结合染色质RNA的RIP
- 为分离和分析染色质上结合的lncRNA、 enhancer RNA & miRNA而优化
- 发现及分析非编码RNA的调控机理
- 下游与RT-qPCR及 RIP-Seq兼容
- 完整配套试剂和完善的protocol
- 试剂盒有阳性及阴性对照抗体、qPCR引物（可选）
- 起始细胞数量范围广（ 5000 ~ 10⁶ , 10⁴ ~10⁶ ）
- 提高信噪比，降低背景 (ProteinA/G, 缓冲液体系)



货号	产品描述
17-10520	Magna Nuclear RIP™ (Cross-Linked) Nuclear RNA-Binding Protein Immunoprecipitation Kit
17-10521	EZ-Magna Nuclear RIP™ (Cross-Linked) Nuclear RNA-Binding Protein Immunoprecipitation Kit
17-10522	Magna Nuclear RIP™ (Native) Nuclear RNA-Binding Protein Immunoprecipitation Kit
17-10523	EZ-Magna Nuclear RIP™ (Native) Nuclear RNA-Binding Protein Immunoprecipitation Kit

需要更多信息，请访问：www.merckmillipore.com/epigenetics

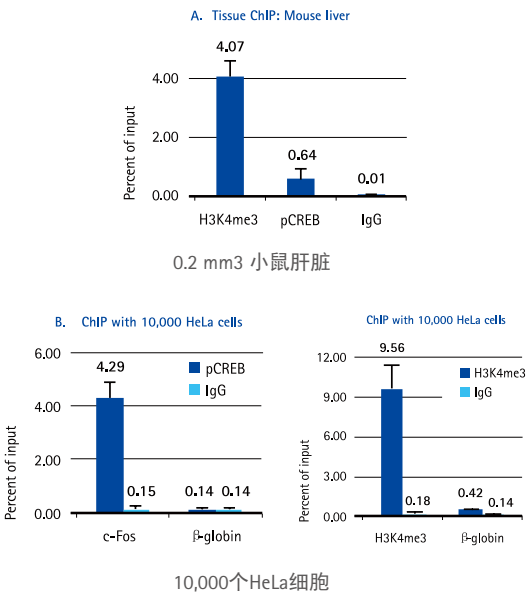
Magna ChIP™ HiSens Kits — 超灵敏ChIP仅需10000个细胞

Magna ChIP™ HiSens kit采用统一的缓冲液体系，兼容更广泛的样本起始量，获得更好的信噪比，以实现超灵敏检测。

产品优势：

- 兼容更广的起始样本量，检测样本量低至10000个细胞 (10,000 到1,000,000 个细胞)
- 无论是细胞或组织样本，都可以获得很好的结果
- 试剂盒提供Protein A/G磁珠，比Protein A 或G 磁珠兼容更广泛的抗体亚型
- 统一的缓冲液体系用于超声，ChIP和清洗，可获得更低的背景和更高的富集倍数
- 特殊的洗脱缓冲液简化了实验操作，无需额外的清除
- 试剂盒提供两种形式：带或不带对照抗体和验证的 qPCR引物对
- 兼容下游实验- qPCR, 二代测序, 生物芯片等

货号	产品描述
17-10460	MagnaChIP HiSens Chromatin IP Kit
17-10461	MagnaChIP HiSens ChromatinIPKit w/controls



Magna ChIP™ HiSens Kit, 1 μg of 特异性抗体 (H3K4Me3, Cat. No. 17-614; Phospho-CREB, Cat. No. 17-10131) 或IgG (normal rabbit IgG, Cat. No. 12-370).

CpGenome™ Direct Prep Bisulfite Modification Kit — 无需抽提DNA的甲基化检测试剂盒

不像其他重亚硫酸盐修饰的方法需要抽提基因组DNA，CpGenome™ Direct Prep和 CpGenome™ Direct Prep-96 试剂盒可以直接用样本进行重亚硫酸盐转化，简单高效。新鲜或冷冻的组织，培养的细胞，全血，白细胞层，活体组织或石蜡包埋样本等都可以直接进行DNA甲基化检测。

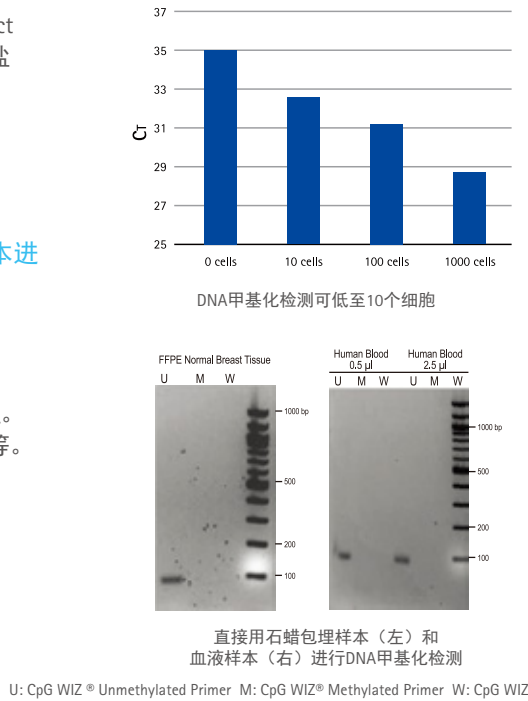
产品优势：

无需抽提DNA，直接对样本：细胞，组织，血液和石蜡包埋样本进行DNA甲基化检测。










转化效率 >99.5%

超高灵敏度，DNA甲基化检测可低至10个细胞或50pg DNA
快速，简单，流程化的操作，一步即可完成重亚硫酸盐转化
柱内脱硫，无需额外的沉淀步骤，保证了DNA的回收率和结果的一致性。
兼容下游分析，如甲基化特异的PCR，酶切反应，测序，芯片杂交等。

货号	产品描述
17-10451	CpGenomeDirectPrepBisulfiteKit 50rxn
17-10452	CpGenomeDirectPrepBisulfiteKit 200rxn
17-10454	CpGenomeDirectPrep96BisulfiteKit



New Antibody

Description	Host	Species Reactivity	Key Applications	Cat. No.
Anti-BANF1, clone EPR7669	Rabbit	Hu	WB, IHC	MABE537
Anti-Bmi-1, clone EPR3745(2)	Rabbit	Hu	WB, IHC	MABE480
Anti-Bonzo	Rabbit	Hu	WB, IHC	ABE604
 Anti-Centrin-2	Rabbit	Hu, Ms, Rt	WB, IC, IHC, IP	ABE480
 Anti-Centrin-3	Rabbit	Hu, Ms, Rt	WB, IP, IC, IHC	ABE481
Anti-CHD-4, clone 3F2/4	Mouse	Hu, Ms	WB, IHC, ChIP, IF	MABE455
Anti-dimethyl G9a (Lys185)	Rabbit	Hu	WB, PIA, IP	ABE489
Anti-dimethyl Histone H3 (Arg17), symmetric	Mouse	Hu	WB, DB, IC	MABE246
Anti-dimethyl Histone H3 (Lys36)	Rabbit	Hu	WB, DB, ChIP	07-369-I
Anti-FOXO4, clone EPR5442	Rabbit	Hu	WB, FC	MABE539
Anti-H2A.Z.2.2, clone 1H11-11	Rat	Hu	WB	MABE347
Anti-HIRA, clone EPR7416	Rabbit	Hu	WB, IF	MABE565
Anti-Histone Deacetylase 6, clone EPR1698(2)	Rabbit	Hu	WB, IHC	MABE546
 Anti-Histone H1°, clone 34	Mouse	Hu, Ms, Rt, Bov, Xenopus	WB, IC, IHC, FC	MABE446
 Anti-Histone H3.3, K27M mutant	Rabbit	Ms, Hu	WB, ChIP	ABE419
Anti-hMCM2, clone 2-40	Mouse	Hu, Ms, Rt	WB	MABE203
Anti-IDH	Rabbit	Hu	WB, IHC(P)	ABE454
Anti-JMJD2D	Rabbit	Hu, Chimp	WB, IHC, IP	ABE499
Anti-KDM1B	Rabbit	Hu, Ms	WB	ABE495
Anti-LSD1, clone EPR6825	Rabbit	Hu, Ms, Rt	WB, IHC	MABE545
 Anti-Mad1, clone BB3-8	Mouse	Hu	WB, IF	MABE867
 Anti-Mad2, clone A555-A12	Mouse	Hu	WB, IF	MABE866
 Anti-monoubiquitin H2A (Lys119)	Rabbit	Hu, Ms	WB, ChIP, IC	ABE569
 Anti-Myb Binding Protein 1A	Rabbit	Hu	WB, IC, ChIP	ABE577
Anti-PERP	Rabbit	Hu	WB, IC	ABE606
 Anti-PHF19	Rabbit	Hu	WB, IP, ChIP	ABE992
Anti-phospho-FOXO4 (Ser262), clone EPR2315(2)	Rabbit	Hu	WB	MABE555
Anti-PTBP2	Rabbit	Hu, Ms, Rt	WB, IP	ABE431
Anti-RAG-1	Rabbit	Hu	WB, IC, IP	ABE440
Anti-Sirt1(Sir2), clone 3-10	Rabbit	Ms	WB, IHC	MABE426
 Anti-Ski, clone G8	Mouse	Hu	WB, IHC	MABE442
Anti-SPT5	Rabbit	Hu	WB, IP	ABE443
Anti-SUV39H1, clone EPR4960(2)	Rabbit	Hu	WB	MABE552
Anti-TCF-4, clone 5F9.1	Mouse	Hu	WB, IHC	MABE361
Anti-TET2	Rabbit	Hu	WB	ABE595
Anti-TET2, clone hT2H 21F11	Mouse	Hu, Ms	WB, IP	MABE462
 Anti-THAP11	Rabbit	Hu, Ms, Rt	WB, IP, ChIP, IHC	ABE567
 Anti-THRAP3	Rabbit	Hu	IP, IC, WB	ABE487
Anti-TIF1- α	Rabbit	Hu, Ms	WB, IC	ABE434
Anti-TIP60, clone 3F9	Mouse	Hu	WB, IHC	MABE430
Anti-UBE2I, clone 1B10	Mouse	Hu, Mky	WB, IF, IHC, FC	MABE429
Anti-USP9X, clone 3H11.1	Mouse	Hu, Ms, Rt	WB, IHC	MABE352
Anti-UTX	Rabbit	Hu, Ms	WB, IC	ABE409
Anti-WBP-7	Rabbit	Hu, Ms, Rt	WB	ABE500
Anti-WDR5, clone 7B11	Mouse	Hu	WB	MABE428
Anti-ZEB1	Rabbit	Hu	WB, IC, IF	ABE596
ChIPAb+™ Acetyl Histone H3 (Lys56)	Rabbit	Hu	WB, DB, ChIP	17-10259
Milli-Mark® Anti-acetyl-Histone H4-PE	Rabbit	Hu	FC	FCABS326PE

PUBLICATION HIGHLIGHT

Anti-Histone H3.3, K27M mutant (Cat. No. ABE419)

In a recent Science paper titled: Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma* the Allis laboratory and colleagues (representing Rockefeller, Princeton, Duke and the University of Pennsylvania) used Merck Millipore's newly released anti-Histone H3.3 K27 mutant, rabbit polyclonal antibody (Cat. No. ABE419) to explore epigenetic control in pediatric glioma and other pathologies. The authors discovered that certain human gliomas containing the missense mutation Lys27Met (K27M) in histone H3.3 displayed lower overall amounts of H3K27me3 both *in vivo* and *in vitro*. The Histone H3K27 mutant-specific antibody from Merck Millipore was used in Western blotting, immunohistochemistry and ChIP analysis to reveal the expression of the gain-of-function mutation and correlate it to the disease state. The researchers propose that K-to-M substitutions may represent a mechanism to alter epigenetic states in a range of pathologies.

NOTE: To help you extend and complement these studies we have also just released a recombinant H3K27M recombinant protein. See the Proteins, Enzymes and Reagents Section on the next page.

*Lewis PW et al. Science. 2013 May 17;340(6134):857-61.

LEGEND

Species: Hu=Human, Ms=Mouse, Rt=Rat, Bov=Bovine, Mky=Monkey, Can=Canine, Prim=Primate, Por= Porcine, Chimp=Chimpanzee, Rhe Mac=Rhesus Macaque, Ham=Hamster, Chk=Chicken

Applications: FC=Flow Cytometry, IC=Immunocytochemistry, IHC=Immunohistochemistry, IHC(P)=Immunohistochemistry (Paraffin), IF=Immunofluorescence, IP=Immunoprecipitation, WB=Western Blotting, ChIP=Chromatin IP, ELISA=Enzyme Immunoassay, DB=Dot Blot, PIA=Peptide Inhibition Assay, CS=Cell Sorting, MeDIP=Methylated DNA IP, CC=Cell Culture, BM=Bisulfite Modification

New Antibody

New Antibodies, Kits, & Proteins

Description	Host	Species Reactivity	Key Applications	Catalogue No.
Anti-26S proteasome regulatory subunit RPN11	Rabbit	Hu, Ms	WB	ABE390
Anti-acetyl-p53(Lys120)	Rabbit	Hu	Dot Blot, IP	ABE286
Anti-APOBEC3G	Rabbit	Hu	WB, IHC	ABE607
Anti-Arylhydrocarbon receptor	Rabbit	Hu	WB, IC	ABE451
Anti-ASXL1	Rabbit	Hu, Rt, Chimp, Rhe Mac, Bov, Can	WB, IHC(P)	ABE400
Anti-BCL-11A	Rabbit	Hu	WB, IC	ABE401
Anti-CTCF	Mouse	Hu	WB, IF	MABN632
Anti-FUS	Mouse	Hu	WB, IHC, IC	MABE465
Anti-HEXIM1	Rabbit	Hu	WB, IF	ABE582
Anti-Histone H3.1/H3.2	Rabbit	Ms, Hu	WB, ChIP-seq, ChIP	ABE154
Anti-hRNF20 Antibody	Rabbit	Hu, Ms, Rt	WB	ABE473
Anti-HuC/HuD, clone 15A7.1	Mouse	Hu, Rt, Ms	WB, IHC(P)	MABN153
Anti-Lin28, clone 13D4.1	Mouse	Hu	WB, IC	MABD53
Anti-McCP2, Isoform B	Rabbit	Hu	WB	ABE333
Anti-MGEA5	Rabbit	Hu	WB, IHC, IF	ABC283
Anti-NFE2L1	Rabbit	Ms	WB	ABE584
Anti-NF-E2-related factor 2	Rabbit	Hu, Ms, Rt, Chimp, Rhe Mac	WB, IC	ABE413
Anti-PHD finger protein 11	Rabbit	Hu, Ms	WB, IC	ABE396
Anti-phospho Cbx7 (Thr118)	Rabbit	Ms	WB	06-1414
Anti-Puromycin, clone 12D10	Mouse	Hu, All	WB, IHC, IC, IF, FC	MABE343
Anti-Puromycin, clone 17H1	Rat	Hu, All	WB	MABE341
Anti-Puromycin, clone 4G11	Mouse	Hu, All	WB, IC, IF, FC, IP	MABE342
Anti-RBBP4, clone 6G5.1	Mouse	Hu	WB	MABE221
Anti-RNA polymerase II subunit B1 (phospho CTD Ser-2), clone 3E10	Rat	Ms, Hu	WB, ChIP	04-1571-I
Anti-RNA polymerase II subunit B1 (phospho-CTD Ser-7), clone 4E12	Rat	Ms, Hu	WB, ChIP	04-1570-I
Anti-Seryl-tRNA ligase, cytoplasmic	Rabbit	Hu	WB, IHC	ABN280
Anti-SHMT1	Sheep	Hu, Ms	WB, ChIP	ABE416
Anti-SIRT4, clone 4F9.1	Mouse	Hu	WB, IHC	MABE223
Anti-TARDBP	Rabbit	Hu	WB, IHC, IF	ABN271
Anti-Tet2	Rabbit	Hu, Rt, Ms	WB, IHC(P), IC	ABE364
Anti-WAC, C-terminus	Rabbit	Hu	WB, IP, ChIP	ABE471
Anti-WAC, N-terminus	Rabbit	Hu, Ms	WB, IP, ChIP	ABE472
Anti-Xrcc1	Rabbit	Hu, Ms, Rt	WB, IP	ABE559
Anti-Zscan4	Rabbit	Ms	WB, IF, IP	AB4340

PUBLICATION HIGHLIGHT ON NEW ANTIBODIES:

Merck Millipore's newly released Anti-Puromycin, clone 12D10 and 4G11 monoclonal antibodies (Catalogue Nos. MABE343 and MABE342) have been published as part of a powerful and sensitive live cell analysis of protein synthesis: "SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis "

The authors used these anti-puromycin 12D10 and 4G11 (cited as 2D11) clones to reveal that puromycin was incorporated during protein synthesis, both with internal proteins and with external, type 2 proteins on live cells. They demonstrated that puromycin immunodetection with Merck Millipore's antibodies is an advantageous alternative to radioactive amino acid labeling, because they enable direct visualization of protein synthesis in individual cells by high-resolution microscopy and may allow the detection of potentially specialized translation areas at subcellular scale, which has not been efficiently achieved until now, even with fluorescent puromycin derivatives. Protein translation can be directly quantified by flow cytometry, even in a subset of cells within larger heterogeneous populations or in cells exposed to pharmacological agents. Their further testing on dendritic and T cells demonstrated the potential of SUnSET for high-throughput drug screening. This technique will have multiple applications in virology, development, host-pathogen interactions, systems/network elucidation and other research areas.

*Schmidt EK et al. Nat Methods. 2009; 6:275-277.

LEGEND

Species: Hu=Human, Ms=Mouse, Rt=Rat, Bov=Bovine, Mky=Monkey, Can=Canine, Prim= Primate, Por= Porcine, Chimp= Chimpanzee, Rhe Mac= Rhesus Macaque, Ham= Hamster

Applications: FC=Flow Cytometry, IC=Immunocytochemistry, IHC=Immunohistochemistry, IHC(P)=Immunohistochemistry (Paraffin), IF=Immunofluorescence, IP=Immunoprecipitation, WB= Western Blotting, ChIP= Chromatin IP, ELISA= Enzyme Immunoassay, DB=Dot Blot

PUBLICATION HIGHLIGHT ON SMALL MOLECULES:

Ezh2 Inhibitor II, EI1 (Cat. No. 5.00561.0001)

Merck Millipore has recently introduced a new inhibitor of Ezh2/PRC2 (Enhancer of zeste homolog 2/Polycomb repressive complex 2) methyltransferase activity.

In a 2012 PNAS paper titled: Selective inhibition of Ezh2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cell proliferation*

Qi and colleagues showed that this inhibitor exhibited about 142-fold greater selectivity over Ezh1 and >10,000-fold selectivity over several other histone methyltransferases (G9a, Suv39H2, Set7/9, CARM1, SmyD2, SETD8, NSD3, SETD2, MLL, and Dot1L). They also report that this Ezh2 inhibitor blocked the growth of diffuse large B cell lymphoma cells carrying Ezh2 mutations and diminished H3K27me3 and H3K27me2 levels without affecting H3K27me1.

* Qi, W. et al. 2012. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109, 21360-21365.

PUBLICATION HIGHLIGHT ON SMALL MOLECULES:

Haspin Kinase Inhibitor, CHR-6494

Merck Millipore has introduced CHR-6494, a new cell-permeable, potent, and reversible inhibitor of histone kinase Haspin ($IC_{50} = 2$ nM) that exhibits moderate selectivity over a variety of kinases, including TrkA, GSK-3 β , PIM1, Cdk1/B and Cdk2/A. In the recent publication: "Anti-tumor activity of a small-molecule inhibitor of the histone kinase Haspin"

Huertas and colleagues showed that CHR-6494 has a wide spectrum of antitumor properties and can cause cell cycle arrest at the G2/M phase, leading to apoptosis. In addition, they demonstrated that it can reduce phospho histone 3 (Thr3) levels in cells and cause metaphase misalignment, spindle abnormalities and centrosome amplification.

*Huertas, D et al. Oncogene 2012; 31: 1408-1418.

Description	Details	Cat. No.
5-Azacytidine	A cell-permeable ribonucleoside analog of cytidine that is reported to readily incorporate into RNA and DNA, and inhibit protein synthesis. Causes DNA methyltransferases depletion, DNA hypomethylation and DNA damage.	5.04317.0001
CRM1 Inhibitor IV, KPT-251	A cell-permeable, irreversible, triazole-containing heterotricyclic CRM1 inhibitor that effectively blocks CRM1-mediated nuclear export (4 h 1 μ M in U2OS cells) via covalent interaction with CRM1 NES- (nuclear export signal) binding groove cysteine (Cys528 in human).	5.00505.0001
Ezh2 Inhibitor II, EI1	A cell-permeable indolocarboxamide compound that acts as a potent and selective inhibitor against Ezh2/PRC2 (Polycomb repressive complex 2; Ezh2/SUZ12/EED/AEBP2/RbAP48) HMTase activity (IC_{50} /substrate = 15 nM/H3K27me021-44 and 13 nM/H3K27me221-44, respectively, against human wt or Y641F Ezh2-containing PRC2; [SAM] = 1 μ M) in a cofactor SAM-competitive manner.	5.00561.0001
Histone Lysine Demethylase Inhibitor VII, GSK-J1	A pyridinyl-pyrimidinylaminopropanoic acid that effectively inhibits KDM6 family H3K27m3 demethylases JMJD3 and UTX (IC_{50} = 18 and 56 μ M, respectively, by MALDI Mass detection) in an α -ketoglutarate-competitive, peptide substrate-non-competitive manner. Recommended for cell-free assays only.	420204-10MG
JQ1 Enantiomers Set	A cell-permeable I-BET (Cat. No. 401010) class of thienodiazepine derivative whose (S)-(+), but not (R)-(-), enantiomer is shown to target both bromodomains (BD1 & BD2) of BET family members BRD2, BRD3, BRD4, and BRD6/BRDT in a Kac- (ϵ N-acetylated lysine) competitive manner.	500586-1SET
L3MBTL3 MBT Domain Blocker, UNC1215	A cell-permeable pyrrolidinyl-piperidinyl-benzamide that effectively competes against H4K20Me2 peptide for L3MBTL3 binding by targeting the first two L3MBTL3 MBT domains (K_d = 120 nM in binding studies using recombinant 3MBT fragment).	5.00557.0001
Epigenetic Regulators Panel - Acetylation	A panel containing 18 potent and selective small molecule regulators that is useful for the study of epigenetic acetylation process.	324893-1EA
Epigenetic Regulators Panel - Methylation	A panel containing 12 potent and selective small molecule regulators that is useful for the study of epigenetic methylation process.	324894-1EA
Haspin Kinase Inhibitor, CHR-6494	A cell-permeable indazolylimidazopyridazinamine compound that acts as a potent and reversible inhibitor of histone kinase haspin activity (IC_{50} = 2 nM) with moderate selectivity over TrkA, GSK-3 β , PIM1, Cdk1/B and Cdk2/A (% inhibition at 100 nM = 58, 48, 36, 34 and 33, respectively) among a panel of 27-kinases.	372040-10MG
Histone Methyltransferase EZH2 Inhibitor, DZNep	A cell-permeable compound that is shown (at 1 μ M concentrations) to inhibit EZH2-mediated trimethylation of K27 on histone H3 and induces the expression of cell-cycle regulatory genes, p21 and p27, as well as the cell death regulator, FBXO32, in OCI-AML3 and HL-60 cells, whereby treatment with inhibitor increases p16 levels in the former, but not the latter of the two cultures.	252790-2MG
Sirt1 Inhibitor VII, Inauhzin	A cell-permeable phenothiazine derivative that selectively inhibits Sirt1 (IC_{50} \leq 2.0 μ M), but not Sirt2, Sirt3, or HCAC8 (IC_{50} > 50 μ M), activity and effectively elevates cellular p53 lysine acetylation (Effective conc. 2 μ M), thereby protecting p53 lysine residues from MDM2-mediated ubiquitination without directly inhibiting MDM2 function per se or its activity toward deacetylated p53.	566332-10MG

LEGEND

Species: Hu=Human, Ms=Mouse, Rt=Rat, Bov=Bovine, Mky=Monkey, Can=Canine, Prim= Primate, Por= Porcine, Chimp= Chimpanzee, Rhe Mac= Rhesus Macaque, Ham= Hamster

Applications: FC=Flow Cytometry, IC=Immunocytochemistry, IHC=Immunohistochemistry, IHC(P)=Immunohistochemistry (Paraffin), IF=Immunofluorescence, IP=Immunoprecipitation, WB= Western Blotting, ChIP= Chromatin IP, ELISA= Enzyme Immunoassay, DB=Dot Blot

For published studies using this new product, visit: www.merckmillipore.com

For publications on using these small molecules, visit: www.merck4biosciences.com

欢迎访问我们的官方网站

www.merckmillipore.com/epigenetics, 我们为您提供表观遗传与基因调控领域的最新消息和完善的表观遗传产品。

- Histone modification
- Maintaining nuclear function
- Chromatin and nucleosome remodeling
- DNA methylation
- Small and non-coding RNA-mediated epigenetic regulation



表观遗传学论坛

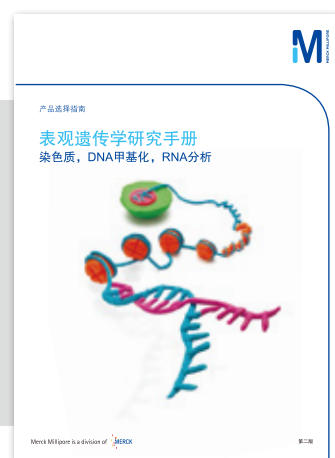
<http://bbs.ebiotrade.com/showforum-2.aspx>

默克密理博与生物通 (www.ebiotrade.com) 合作, 推出专业博客, 欢迎表观研究高手在此切磋技术、分享经验, 了解最新进展。



新版表观中文手册

- 组蛋白修饰
- 染色质免疫共沉淀
- DNA甲基化
- 转录及转录后调控
- DNA结构、损伤与修复



上海
上海市浦东新区张江高科
晨晖路88号二号楼2楼
电话: (021)20338288
传真: (021)50803042
邮编: 201203

北京
北京市朝阳区曙光西里甲5号
凤凰置地广场A座写字楼18层
电话: (010)59898600
传真: (010)57623560
邮编: 100022

广州
广州黄埔大道西838号
富力科讯大厦803A室
电话: (020)37883048
传真: (020)37883072
邮编: 510627

成都
成都市锦江区东大街芷泉街
东方广场C座11楼7号
电话: (028)85288550
传真: (028)85288553
邮编: 610060

中国技术服务中心: asiatechserv@merckgroup.com