



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110320357 A

(43)申请公布日 2019.10.11

(21)申请号 201910575929.X

(22)申请日 2019.06.28

(71)申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

(72)发明人 吴珍芳 顾婷 甘炎民 周健
邢萍萍 谭宝华 蔡更元 李紫聪
洪林君 杨杰 郑恩琴

(74)专利代理机构 广东广信君达律师事务所
44329

代理人 杨晓松

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

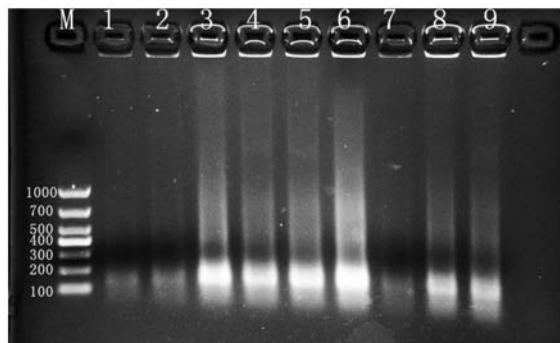
权利要求书2页 说明书12页 附图5页

(54)发明名称

一种针对组织的自然染色质免疫沉淀处理
方法

(57)摘要

本发明属于生物技术领域，具体涉及一种针对组织的自然染色质免疫沉淀处理方法。本发明采用Douncing Buffer和特殊研磨手段等方式裂解猪骨骼肌组织，初步获得组织悬液，在微链球菌核酸酶的消化下，获得了高产量的且质量高的染色质，然后采用磁珠吸附的方式去除背景DNA，得到预清除背景DNA的上清液；最后将预清除背景DNA的上清液进行免疫沉淀、样品清洗、洗脱、DNA纯化和检测，该方法获得的染色质的产量和质量很高，适用于肝脏、脑、肺和胎盘等组织以及哺乳动物早期胚胎细胞核的收集，利用该方法可以使完整细胞核的产量最大化。同时，该方法保持了染色质制备过程中抗体识别表位的完整性。



1.一种针对组织的自然染色质免疫沉淀处理方法,其特征在于包含如下步骤:

(1) 将ProteinA磁珠储存液和ProteinG磁珠储存液分别充分混匀,然后将ProteinA磁珠储存液和ProteinG磁珠储存液按两种磁珠质量比1:1的比例充分混匀,得到混合磁珠储存液;

(2) 在步骤(1)制得的混合磁珠储存液中加入IP Buffer并充分混匀以清洗混合磁珠,然后低温离心,使混合磁珠初步沉淀成块,进一步将混合磁珠储存液放到磁力架上磁力分离直至混合磁珠全部沉淀;重复上述操作再次清洗混合磁珠;

(3) 在步骤(2)清洗后的混合磁珠中加入IP Buffer、10mg/ml的单链三文鱼精子DNA和10mg/ml BSA溶液,2~5℃旋转混匀封闭2~4h;其中,ProteinA磁珠、ProteinG磁珠、IP Buffer、单链三文鱼精子DNA溶液、BSA溶液的质量体积比为:600μg:600μg:1ml:30μl:75μl;取出封闭旋转后的混合磁珠,低温离心,加入IP Buffer按照步骤(2)所述的方法再次继续清洗1次;用IP Buffer重悬混合磁珠,得到预处理混合磁珠溶液;

(4) 将组织样品液氮研磨成粉末后,加入冰上预冷的Douncing Buffer,使用匀浆机匀浆裂解2~3min;然后采用移液器反复吹打15~30次进一步消化裂解,最后采用带针注射器反复吸入和打出15~30次再次消化裂解,从而保证所有组织被完全消化裂解;其中,组织中脂肪比较多,匀浆机打不碎,匀浆裂解后如不采用移液器反复吹打,则很难用带针注射器反复吸入和打出,导致无法完全消化裂解;

(5) 在消化裂解后的组织样品中加入微球菌核酸酶溶液36~38℃孵育6~10min后,加入终浓度为10mM的EDTA冰上孵育4~10min以终止反应;然后加入低渗裂解液并混匀,冰上孵育50~90min,期间每间隔8~12min颠倒混匀上述体系;最后低温离心,收集上清液;

(6) 取步骤(3)制得的预处理混合磁珠溶液和步骤(5)制得的上清液按照体积比1:(1~10)的比例混合,2~5℃封闭旋转2~3h;低温离心,收集得到预清除背景DNA的上清液;

(7) 将步骤(6)制得的预清除背景DNA的上清液进行免疫沉淀;

(8) 将步骤(7)免疫沉淀后的样品进行清洗、洗脱、DNA纯化和检测。

2.根据权利要求1所述的针对组织的自然染色质免疫沉淀处理方法,其特征在于:

步骤(1)中所述的IP Buffer包含如下按终浓度计的组分:10mM Tris-HCl、1wt% Triton X-100、0.10wt% Deoxycholate、0.10wt% SDS、90mM NaCl、2mM EDTA、1×PIC。

3.根据权利要求1所述的针对组织的自然染色质免疫沉淀处理方法,其特征在于:

步骤(3)中所述的预处理混合磁珠溶液中ProteinA磁珠、ProteinG磁珠的终浓度为2μg/μl、2μg/μl。

4.根据权利要求1所述的针对组织的自然染色质免疫沉淀处理方法,其特征在于:

步骤(4)中所述的Douncing Buffer包含如下按终浓度计的组分:10mM Tris-HCl、4mM MgCl₂、1mM CaCl₂和1×PIC。

5.根据权利要求1所述的针对组织的自然染色质免疫沉淀处理方法,其特征在于:

步骤(4)中所述的组织样品和Douncing Buffer的质量体积比为30mg:250μl。

6.根据权利要求1所述的针对组织的自然染色质免疫沉淀处理方法,其特征在于:

步骤(5)中所述的微球菌核酸酶溶液初始浓为100Units/μl;

步骤(4)中所述的组织样品和步骤(5)中所述的微球菌核酸酶溶液的质量体积比为30mg:10μl。

7. 根据权利要求1所述的针对组织的自然染色质免疫沉淀处理方法,其特征在于:

步骤(5)中所述的低渗裂解液包含如下按终浓度计的组分:

0.2mM EDTA、0.1mM 苯甲脒、0.1mM PMSF、1.5mM 二硫苏糖醇、1×PIC。

8. 根据权利要求1所述的针对组织的自然染色质免疫沉淀处理方法,其特征在于:

步骤(7)中所述的免疫沉淀的具体操作为:

将步骤(6)制得的预清除背景DNA的上清液分装到离心管中,每个管分装240~300μl,即每个IP用6~7.5mg的组织;每个IP管加入IP Buffer使总体积达到325μl;然后加入4μl抗体,4℃旋转混匀1h;最后加入20μl步骤(3)到制得的预处理混合磁珠溶液,4℃旋转混匀10~12h。

9. 根据权利要求1所述的针对组织的自然染色质免疫沉淀处理方法,其特征在于:

步骤(8)中所述的清洗的具体过程为:

①将步骤(7)免疫沉淀后的样品4℃、4000rpm离心2min;在磁力架上放置15s使磁珠充分沉淀,去除上清液;

②清洗:在沉淀中加入400μl的ChIP Wash Buffer,轻轻震荡10s,4℃旋转封闭3min;4℃、4000rpm离心2min,在磁力架上放置15s使磁珠充分沉淀,去除上清液;

③在沉淀中加入400μl的ChIP Wash Buffer,按照步骤②方法,再次清洗一次;最后加入ChIP Final Wash Buffer,按照步骤②方法,再次清洗一次。

10. 根据权利要求1所述的针对组织的自然染色质免疫沉淀处理方法,其特征在于:

步骤(8)中所述的洗脱的具体过程为:

在清洗后的的IP样品中加入100μl Elution Buffer和0.5μl 10μg/μl的RNase,68℃孵育2h,4000rpm/2min离心,收集上清;在离心后的磁珠中再次加入100μl Elution Buffer,68℃孵育5min,4000rpm/2min离心,收集上清;合并上清。

一种针对组织的自然染色质免疫沉淀处理方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种针对组织的自然染色质免疫沉淀处理方法。

背景技术

[0002] 在细胞和组织中,构成核小体的组蛋白表现出多种翻译后修饰,例如赖氨酸乙酰化、赖氨酸和精氨酸甲基化、丝氨酸磷酸化和赖氨酸泛素化等(Jenuwein,T.,and Allis,C.D.(2001).Translating the histone code.SCIENCE.)。这些核心组蛋白上的共价修饰在真核生物的染色质组织和基因表达中起着重要作用。研究证实组蛋白修饰能够激活或抑制转录,以及调节DNA修复和复制(Turner,B.M.(2002).Cellular Memory and the Histone Code.CELL 111,285-291.)。而要揭示生物体内特定位点组蛋白修饰作用,染色质免疫共沉淀技术是首选方法。

[0003] 染色质免疫共沉淀(Chromatin Immunoprecipitation,ChIP)是一种研究活体状态下组蛋白与DNA互作的实验技术(Rodríguez-Ubreva,J.,and Ballestar,E.(2004).Chromatin immunoprecipitation.Methods in Molecular Biology 285,41.)。其基本原理是在活细胞状态下固定蛋白质与互作DNA的复合物,使用生物或者物理方法将其核小体间的Linker DNA随机切断为一定长度范围内的染色质小片段,通过使用特异性抗体结合特异蛋白来获取能与目的蛋白相结合的DNA片段,通过对目的片段的纯化与检测,从而获得蛋白质与DNA相互作用的信息(Collas,P.(2010).The Current State of Chromatin Immunoprecipitation.MOL BIOTECHNOL 45,87-100.)。ChIP不仅用于检测体内DNA与转录因子的动态作用,还被应用于研究组蛋白的各种共价修饰与基因表达的关系。通过研究转录因子和靶基因启动子区域的直接互作关系,可以确定其在体内相互作用的动态变化,从而得到转录因子结合位点信息,以确定其靶基因(Orlando,V.(2000).Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation.TRENDS BIOCHEM SCI 25,99-104.)。近年来,随着ChIP技术的不断完善,其已被广泛应用于研究体内转录调控因子和靶基因启动子上特异核酸序列结合(Nelson,J.D.,Denisenko,O.,and Bomsztyk,K.(2006).Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation(ChIP) method.NAT PROTOC 1,179-185.)。

[0004] 染色质免疫沉淀法根据第一步对染色质处理方式的不同,分为交联染色质免疫沉淀(XChIP)和自然染色质免疫沉淀(NChIP)两种不同的实验方法.XChIP使用化学物质交联染色质后使用超声波破碎,而NChIP使用micrococcal核酸酶剪切(Turner,B.(2001).ChIP with Native Chromatin:Advantages and Problems Relative to Methods Using Cross-Linked Material.)。XChIP使用可逆的交联染色质作为原材料,适于定位转录因子的目的DNA或染色质关联蛋白。用甲醛(Jackson,V.(1978).Studies on histone organization in the nucleosome using formaldehyde as a reversible cross-linking agent.CELL 15,945-954.)或者紫外光(Gilmour,D.S.,and Lis,J.T.(1985).In

vivo interactions of RNA polymerase II with genes of *Drosophila melanogaster*. Molecular&Cellular Biology 5, 2009.) 作为交联的介质,通过超声波破碎后可得到300–1000bp的DNA片段 (Nelson, J.D., Denisenko, O., and Bomsztyk, K. (2006) .Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. NAT PROTOC 1, 179–185.)。与XChIP不同,NChIP的原料是未经处理的染色质。并且核酸酶消化作为更有优势的方法已经取代超声剪切染色质 (Hebbes, T.R., Thorne, A.W., and Crane-Robinson, C. (1988) .A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. EMBO J 7, 1395–1402.) ,这种方法获取的片段为100–200bp,可覆盖2–4个组蛋白,适用于ChIP实验。剪切后的细胞碎片通过免疫沉淀,免疫沉淀复合体(磁珠-抗体-蛋白-DNA序列)运用特殊的抗体结合蛋白受体。这些抗体通常被结合到琼脂糖或者磁珠蛋白球粒上。DNA交联蛋白和其他蛋白被蛋白酶K消化后,收集洗脱预清除了背景DNA的染色质 (Beynon, A.L., Parkes, L.J., Turner, M.L., Knight, S., Conlan, S., Francis, L., and Stocks, B. (2014) . Chromatrap® 96:a new solid-state platform for high-throughput ChIP. NAT METHODS 11, 972.)。最后复合物交联的DNA可通过多种方法纯化鉴定。

[0005] NChIP(Immunoprecipitation of native chromatin)的主要优势是抗体特异性 (Turner, B. (2001) . ChIP with Native Chromatin:Advantages and Problems Relative to Methods Using Cross-Linked Material.)。修饰组蛋白的大多数抗体是针对未固定的合成肽抗原而产生的,而在XChIP中染色质经过甲醛或紫外照射交联处理后,其所识别的抗原表位很可能被破坏,特别是当交联涉及N末端的赖氨酸ε-氨基时,会破坏其抗原表位,导致染色质回收率低下。同时,由于瞬时蛋白固定在染色质上,这可能导致假阳性结果。而NChIP使用的是未经处理的染色质,使用micrococcal核酸酶剪切,这种方法很好地保证了靶蛋白的天然完整性,使其具有较好的抗体特异性,抗体特异性好同时意味着染色质和蛋白质的回收率高 (Neill, L.P., and Turner, B.M. (2003) . Immunoprecipitation of native chromatin:NChIP. METHODS 31, 76–82.)。

[0006] 然而,现有的NChIP技术仅适用于细胞系,在动植物组织中罕有报道,而组织受到外膜和结缔组织等包裹,直接进行基因组切割等操作效率较低。

发明内容

[0007] 为了克服现有技术的不足和缺点,本发明的首要目的在于提供一种针对组织的自然染色质免疫沉淀处理方法。

[0008] 本发明的目的通过下属技术方案实现:

[0009] 一种针对组织的自然染色质免疫沉淀处理方法,包含如下步骤:

[0010] (1) 将ProteinA磁珠储存液和ProteinG磁珠储存液分别充分混匀,然后将ProteinA磁珠储存液和ProteinG磁珠储存液按两种磁珠质量比1:1的比例充分混匀,得到混合磁珠储存液;

[0011] (2) 在步骤(1)制得的混合磁珠储存液中加入IP Buffer并充分混匀以清洗混合磁珠,然后低温离心,使混合磁珠初步沉淀成块,进一步将混合磁珠储存液放到磁力架上磁力分离直至混合磁珠全部沉淀;重复上述操作再次清洗混合磁珠;

[0012] (3) 在步骤(2)清洗后的混合磁珠中加入IP Buffer、10mg/ml的单链三文鱼精子DNA和10mg/ml BSA(牛血清白蛋白)溶液,2~5℃旋转混匀封闭2~4h;其中,ProteinA磁珠、ProteinG磁珠、IP Buffer、单链三文鱼精子DNA溶液、BSA溶液的质量体积比为:600μg:600μg:1ml:30μl:75μl;取出封闭旋转后的混合磁珠,低温离心,加入IP Buffer按照步骤(2)所述的方法再次继续清洗1次;用IP Buffer重悬混合磁珠,得到预处理混合磁珠溶液;

[0013] (4) 将组织样品液氮研磨成粉末后,加入冰上预冷的Douncing Buffer(DB),使用匀浆机匀浆裂解2~3min;然后采用移液器反复吹打15~30次进一步消化裂解,最后采用带针注射器反复吸入和打出15~30次再次消化裂解,从而保证所有组织被完全消化裂解;其中,组织中脂肪比较多,匀浆机打不碎,匀浆裂解后如不采用移液器反复吹打,则很难用带针注射器反复吸入和打出,导致无法完全消化裂解;

[0014] (5) 在消化裂解后的组织样品中加入微球菌核酸酶溶液36~38℃孵育6~10min后,加入终浓度为10mM的EDTA冰上孵育4~10min以终止反应;然后加入低渗裂解液并混匀,冰上孵育50~90min,期间每间隔8~12min颠倒混匀上述体系;最后低温离心,收集上清液;

[0015] (6) 取步骤(3)制得的预处理混合磁珠溶液和步骤(5)制得的上清液按照体积比1:(1~10)的比例混合,2~5℃封闭旋转2~3h;低温离心,收集得到预清除背景DNA的上清液;

[0016] (7) 将步骤(6)制得的预清除背景DNA的上清液进行免疫沉淀;

[0017] (8) 将步骤(7)免疫沉淀后的样品进行清洗、洗脱、DNA纯化和检测;

[0018] 步骤(1)中所述的IP Buffer包含如下按终浓度计的组分:10mM Tris-HCl(PH 8.0)、1wt% Triton X-100、0.10wt% Deoxycholate(DOC)、0.10wt% SDS、90mM NaCl、2mM EDTA、1×PIC(Protease Inhibitor Cocktail);

[0019] 步骤(2)中所述的低温离心的条件优选为4℃、4000rpm离心2min;

[0020] 步骤(3)中所述的预处理混合磁珠溶液中ProteinA磁珠、ProteinG磁珠的终浓度优选为2μg/μl、2μg/μl;

[0021] 步骤(3)中所述的低温离心的条件优选为4℃、4000rpm离心2min;

[0022] 步骤(4)中所述的匀浆机的功率优选为125w,频率优选为50~60Hz;

[0023] 步骤(4)中所述的Douncing Buffer包含如下按终浓度计的组分:10mM Tris-HCl(PH 7.5)、4mM MgCl₂、1mM CaCl₂和1×PIC;

[0024] 步骤(4)中所述的组织样品和Douncing Buffer的质量体积比优选为30mg:250μl;

[0025] 步骤(4)中所述的注射器针头的规格优选为25 5/8gauge;

[0026] 步骤(5)中所述的微球菌核酸酶溶液初始浓度优选为100Units/μl;

[0027] 步骤(4)中所述的组织样品和步骤(5)中所述的微球菌核酸酶溶液的质量体积比优选为30mg:10μl;

[0028] 步骤(5)中所述的低渗裂解液(Hypotonic Lysis Buffer)包含如下按终浓度计的组分:

[0029] 0.2mM EDTA(PH 8.0)、0.1mM苯甲脒(Benzamidine)、0.1mM PMSF、1.5mM二硫苏糖醇(DTT)、1×PIC(Protease Inhibitor Cocktail);

[0030] 步骤(4)中所述的组织样品和步骤(5)中所述的低渗裂解液的质量体积比优选为30mg:1ml;

[0031] 步骤(5)中所述的低温离心的条件优选为4℃、3000rpm离心5min;

[0032] 步骤(6)中所述的低温离心的条件优选为4℃、4000rpm离心2min;

[0033] 步骤(7)中所述的免疫沉淀的具体操作优选为:

[0034] 将步骤(6)制得的预清除背景DNA的上清液分装到离心管中,每个管分装240~300μl,即每个IP用6~7.5mg的组织(根据需要做IP的个数,即抗体个数,包括阴性对照IgG和感兴趣的抗体个数);每个IP管加入IP Buffer使总体积达到325μl;然后加入4μl抗体,4℃旋转混匀1h;最后加入20μl步骤(3)到制得的预处理混合磁珠溶液,4℃旋转混匀10~12h;

[0035] 所述的IP Buffer包含如下按终浓度计的组分:10mM Tris-HCl (PH 8.0)、1% Triton X-100、0.10% Deoxycholate (DOC)、0.10% SDS、90mM NaCl、2mM EDTA、1×PIC (Protease Inhibitor Cocktail);

[0036] 步骤(8)中所述的清洗的具体过程优选为:

[0037] ①将步骤(7)免疫沉淀后的样品4℃、4000rpm离心2min;在磁力架上放置15s使磁珠充分沉淀,去除上清液;

[0038] ②清洗:在沉淀中加入400μl的ChIP Wash Buffer,轻轻震荡10s,4℃旋转封闭3min;4℃、4000rpm离心2min,在磁力架上放置15s使磁珠充分沉淀,去除上清液;

[0039] ③在沉淀中加入400μl的ChIP Wash Buffer,按照步骤②方法,再次清洗一次;最后加入ChIP Final Wash Buffer,按照步骤②方法,再次清洗一次;

[0040] 所述的ChIP Wash Buffer包含如下按终浓度计的组分:20mM Tris-HCl (PH8.0)、0.10wt% SDS、1wt% Triton X-100、2mM EDTA、150mM NaCl、1×PIC;

[0041] 所述的ChIP Final Wash Buffer包含如下按终浓度计的组分:20mM Tris-HCl (PH 8.0)、0.10% SDS、1wt% Triton X-100、2mM EDTA、500mM NaCl、1×PIC;

[0042] 步骤(8)中所述的洗脱的具体过程优选为:

[0043] 在清洗后的的IP样品中加入100μl Elution Buffer和0.5μl 10μg/μl的RNase,68℃孵育2h,4000rpm/2min离心,收集上清;在离心后的磁珠中再次加入100μl Elution Buffer,68℃孵育5min,4000rpm/2min离心,收集上清;合并上清;

[0044] 所述的Elution Buffer包含如下按终浓度计的组分:100mM NaHCO₃、1wt% SDS;

[0045] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:

[0046] (1)本发明适用于肝脏、脑、肺和胎盘等组织以及哺乳动物早期胚胎细胞核的收集。利用该方法可以使完整细胞核的产量最大化。同时,保持了染色质制备过程中抗体识别表位的完整性,这一点对后续免疫沉淀实验中提取与特异性蛋白结合的DNA片段十分有利。

[0047] (2)本发明针对组织的处理方法操作简单,且对组织样品的要求不高,相较于传统的细胞学方法,该方法操作简便,省时,需要的样品量少,只需30mg组织样品经过本发明方法处理后即可开展ChIP实验,获得的ChIP-DNA不亚于常规细胞学方法。

[0048] (3)本发明中利用微链球菌核酸酶处理方法处理组织悬液,对比甲醛交联染色质法或是超声波切割法,该方法保持了染色质制备过程中抗体识别表位的完整性,天然染色质对特定组蛋白修饰的沉淀水平更高。在微链球菌核酸酶处理下,核小体之间发生了分馏,而不是被随机切割,因此在本发明中9组组织样品消化下来的DNA片段大小均保持一致(如图3),且获得的DNA产量高,特别适用于后续ChIP的研究。

附图说明

[0049] 图1是对比实施例1中肌肉组织单独液氮研磨处理、微链球菌核酸酶消化后苯酚抽提的DNA大小检测电泳图；其中，M:marker，泳道1~3:33天猪胎儿背最长肌3组，泳道4~6:65天猪胎儿背最长肌3组，泳道7~9:90天猪胎儿背最长肌3组。

[0050] 图2是对比实施例2中肌肉组织单独匀浆机处理、微链球菌核酸酶消化后苯酚抽提的DNA大小检测电泳图；其中，M:marker，泳道1~3:33天猪胎儿背最长肌3组，泳道4~6:65天猪胎儿背最长肌3组，泳道7~9:90天猪胎儿背最长肌3组。

[0051] 图3是实施例1中肌肉组织单独液氮研磨处理+匀浆机处理、微链球菌核酸酶消化后苯酚抽提的DNA大小检测电泳图；其中，M:marker，泳道1~3:33天猪胎儿背最长肌3组，泳道4~6:65天猪胎儿背最长肌3组，泳道7~9:90天猪胎儿背最长肌3组。

[0052] 图4是9组猪胎儿背最长肌组织样品在H3K27me3组蛋白钓取下呈现的峰形图(IGV可视化分析图)；其中，1~3:33天猪胎儿背最长肌样品3组，4~6:65天猪胎儿背最长肌样品3组，7~9:90天猪胎儿背最长肌样品3组。

[0053] 图5是ChIP数据的FastQC质量评估结果(所有碱基的质量得分)分析图；其中，横轴代表碱基位置，纵轴为质量得分，颜色区分不同的质量区段，虚线方框区域为质量合格区段。

[0054] 图6是ChIP数据的FastQC质量评估结果(所有序列的质量得分分布)分析图；其中，横轴代表质量值，纵轴为每个值对应的read数目，当测序结果主要集中在高分区间中，证明测序质量良好。

[0055] 图7是ChIP数据的FastQC质量评估结果(所有碱基的序列内容)分析图；其中，横轴为碱基位置，纵轴为碱基百分比，图中四条线分别表示A、T、C、G在每个位置上的平均含量，A与T出现频率相近，C与G出现频率相近，表示数据质量合格。

[0056] 图8是ChIP数据的FastQC质量评估结果(所有序列的GC含量)分析图；其中，横轴表示GC含量，纵轴表示不同GC含量对应的read数，Theoretical distribution为理论分布，GC count per read为实际分布，两者形态接近说明数据质量高。

[0057] 图9是ChIP数据的FastQC质量评估结果(所有碱基的N含量)分析图；其中，横轴为碱基位置，纵轴为N比率，N表示无法识别的碱基，N的比率低说明数据质量高。

[0058] 图10是ChIP数据的FastQC质量评估结果(非重复部分达到87.49%)分析图；其中，横轴表示重复的次数，纵轴表示重复的reads的数目，图中非重复部分达到87.49%说明数据合格。

具体实施方式

[0059] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述，但本发明的实施方式不限于此。

[0060] 实施例中，ProteinA磁珠储存液和ProteinG磁珠储存液购自百迈格生物技术有限公司，磁力架购自百迈格生物技术有限公司；

[0061] Deoxycholate (DOC) 购自阿拉丁试剂(上海)有限公司；PIC (Protease Inhibitor Cocktail) 购自sigma-aldrich西格玛奥德里奇(中国)贸易有限公司，Triton X-100购自碧云天生物技术有限公司；

[0062] 芬甲脒 (Benzamidine) 购自 sigma-aldrich 西格玛奥德里奇 (中国) 贸易有限公司, PMSF (100mM) 购自碧云天生物技术有限公司, 二硫苏糖醇 (DTT) 购自 Merck 默克 (中国) 有限公司; 微球菌核酸酶购自 NEB 纽英伦生物技术 (北京) 有限公司;

[0063] 实施例1

[0064] (一) 准备磁珠

[0065] (1) 将 ProteinA 磁珠储存液 (磁珠浓度 10mg/ml) 和 ProteinG 磁珠储存液 (磁珠浓度 10mg/ml) 上下颠倒几次, 重悬蛋白琼脂糖磁珠, 使充分混合均匀; 然后从每管中取出磁珠各 60μl (为了更容易的吸取, 可以事先把黄色枪头的尖剪掉; 可根据样品量调整磁珠的用量), 将 2 种磁珠加入 1.5ml 的硅化离心管中, 用剪过的黄枪头上下吹打几次, 混匀, 得到混合磁珠储存液;

[0066] (2) 在步骤 (1) 制得的混合磁珠储存液中加入 1ml IP Buffer (IP Buffer 配制方法见表 1), 上下颠倒几次来清洗混合磁珠, 然后 4℃ 冷冻离心机 4000rpm/2min 离心, 使混合磁珠初步沉淀成块; 将离心管放到磁力架上持续 15s 直至混合磁珠全部沉淀; 用 200μl 的枪头将上清液吸出去除, 吸取时避免吸到混合磁珠; 重复上述操作 IP Buffer 再次清洗一次;

[0067] (3) 在步骤 (2) 清洗后的混合磁珠中加入 1ml IP Buffer, 30μl 的 10mg/ml 的单链三文鱼精子 DNA, 75μl 的 10mg/ml BSA 溶液, 4℃ 旋转混匀封闭 3h (注: 在封闭磁珠的 3h 内, 可继续做核酸酶消化的步骤); 然后 4℃ 冷冻离心机 4000rpm/2min 离心, 加入 IP Buffer 按照步骤 (2) 所述的方法再次继续清洗 1 次; 最后用 300μl 的 IP Buffer 重悬混合磁珠, 得到预处理混合磁珠溶液, 储存在 4℃ 直至需要;

[0068] 表 1 IP Buffer 的组分及终浓度

	IP Buffer	母液浓度	工作液浓度	For 5ml
[0069]	Tris-HCl(PH 8.0)	1M	10mM	50μl
	Triton X-100	10%	1%	500μl
	Deoxycholate(DOC)	10%	0.10%	50μl
	SDS	10%	0.10%	50μl
	NaCl	5M	90mM	90μl
	EDTA	0.5M	2mM	20μl
	PIC	25×	1×	200μl
	ddH ₂ O			4040μl
Total				5000μl

[0070] (二) 组织的研磨及微球菌核酸酶消化

[0071] (1) 准备干净的研钵以及研磨棒; 于研钵中加入液氮, 取 30mg 猪的骨骼肌组织样品于研钵中, 开始研磨直至组织样品被研成粉末; 将粉末状的组织全部转移至干净的 2ml 离心管中; 每份样品中加入 250μl Douncing Buffer (DB), 使用匀浆机 (功率为 125w, 频率为 50~60Hz) 匀浆裂解 2.5min; 然后采用 1ml 移液器反复吹打 20 次进一步消化裂解, 最后采用带针注射器 (注射器规格 1ml, 针头的规格为 25 5/8gauge) 反复吸入和打出 20 次再次消化裂解,

从而保证所有组织被完全消化裂解；其中，组织中脂肪比较多，匀浆机打不碎，匀浆裂解后如不采用移液器反复吹打，则很难用带针注射器反复吸入和打出，导致无法完全消化裂解；

[0072] (2) 微球菌核酸酶消化：在消化裂解后的组织样品中加入10 μ l 100Units/ μ l的微球菌核酸酶(0.5 μ l微球菌核酸酶+9.5 μ l Buffer,注：可在第一次使用前将酶分装，避免反复冻融)，37℃孵育7min；加入5 μ l 0.5M的EDTA (EDTA的终浓度是10mM)，冰上孵育5min以终止反应；然后加入1ml的低渗裂解液后混匀，冰上孵育60min，每间隔10min简单地上下混匀一下；最后4℃冷冻离心机3000rpm/5min离心，上清液转移到新的1.5ml离心管中；

[0073] 表2低渗裂解液(Hypotonic Lysis Buffer)的组分及终浓度

Hypotonic Lysis Buffer		母液浓度	工作液浓度	For 5ml
[0074]	EDTA(PH 8.0)	0.5M	0.2mM	2 μ l
	Benzamidine	1M	0.1mM	0.5 μ l
	PMSF	100mM	0.1mM	5 μ l
	DTT	0.5M	1.5mM	15 μ l
	PIC	100x	1x	50 μ l
	ddH ₂ O			4790 μ l
Total				5000 μ l

[0075] 表3 Douncing Buffer(DB)的组分及终浓度

Douncing Buffer(DB)		母液浓度	工作液浓度	For 1ml
[0076]	Tris-HCl(PH 7.5)	1M	10mM	10 μ l
	MgCl ₂	1M	4mM	4 μ l
	CaCl ₂	0.5M	1mM	2 μ l
	PIC	100x	1x	10 μ l
	ddH ₂ O			974 μ l
	Total			1000 μ l

[0077] (三) 荚酚抽提检测DNA大小

[0078] 锁相离心管中加入的100 μ l步骤(二)制得的上清液、100 μ l ddH₂O和200 μ l的25:24:1(体积比)的苯酚-氯仿-异戊醇，颠倒混匀几次，4℃冷冻离心机最大转速离心5min；转移上层液体到新的1.5ml离心管中，加入500 μ l冰无水乙醇和20 μ l 3M NaOAc，震荡混匀，在-20℃冰箱放置孵育30min(如果时间不够后面步骤可以放着过夜)，4℃冷冻离心机最大转速离心20min；取上清并采用体积分数为70%的酒精清洗一遍，4℃冷冻离心机最大转速离心5min；弃去上清液，将EP管盖打开放在通风橱中风干半小时，然后加50 μ l ddH₂O溶解DNA，取5 μ l在质量体积比为1.5%的琼脂糖凝胶检测酶切后的DNA大小。电泳检测结果见图3。

[0079] 图3为步骤(二)组织研磨及微球菌核酸酶消化后制得的上清液的电泳图，从图中

可以看出,采用本发明的处理方法可以获得高产量和高质量的DNA,得到的不同组织DNA片段,均保持一样大小,且无其他杂带产生,说明,组织处理及微链球菌核酸酶在对组织悬液的消化过程中,抗体识别的表位在染色质制备过程中保持完整。

[0080] (四) 预清除背景DNA

[0081] 取100 μ l步骤(一)制得的预处理混合磁珠溶液加入步骤(二)制得的剩余上清液中,然后4℃封闭旋转2h;4℃冷冻离心机4000rpm/2min离心,取上清液到1.5ml离心管中,得到预清除背景DNA的上清液;

[0082] (五) 免疫沉淀

[0083] (1) 将步骤(四)制得的预清除背景DNA的上清液分到干净的1.5ml离心管中,每个管分装240~300 μ l,即每个IP用6~7.5mg的组织(根据需要做IP的个数,即抗体个数,包括阴性对照IgG和感兴趣的抗体个数);另,取出步骤(四)制得的预清除背景DNA的上清液总体积的10%作为Input DNA冻存于-20℃冰箱,后续作为沉淀前的DNA总量来计算被各种抗体钓取出来的DNA含量的百分比。

[0084] (2) 每个IP管加入IP Buffer使总体积达到325 μ l,再加入4 μ l H3K27me3抗体后用封口膜封好管口,4℃旋转混匀1h;然后加入20 μ l步骤(一)制得的预处理混合磁珠溶液到每个IP管中,用封口膜封好管口,4℃旋转混匀10~12h;

[0085] (六) 样品的清洗

[0086] (1) 将步骤(五)免疫沉淀后的样品4℃冷冻离心机4000rpm/2min离心;在磁力架上放置15s使磁珠充分沉淀,用200 μ l的枪头去除上清液,避免扰动磁珠;

[0087] (2) 清洗:在沉淀中加入400 μ l的ChIP Wash Buffer(表4)后轻轻震荡10s,4℃旋转封闭3min。4℃冷冻离心机4000rpm/2min离心,在磁力架上放置15s使磁珠充分沉淀,用200 μ l的枪头去除上清液,避免扰动磁珠;

[0088] (3) 在沉淀中加入400 μ l的ChIP Wash Buffer,按照步骤②方法,再次清洗一次;最后加入ChIP Final Wash Buffer(表5),按照步骤②方法,再次清洗一次;

[0089] 表4 ChIP Wash Buffer的组分及终浓度

	ChIP Wash Buffer	母液浓度	工作液浓度	For 5ml
	Tris-HCl(PH 8.0)	1M	20mM	100 μ l
	SDS	10%	0.10%	50 μ l
	Triton X-100	10%	1%	500 μ l
[0090]	EDTA	0.5M	2mM	20 μ l
	NaCl	5M	150mM	150 μ l
	PIC	25x	1x	200 μ l
	ddH ₂ O			3980 μ l
	Total			5000 μ l

[0091] 表5 ChIP Final Wash Buffer+PIC的组分及终浓度

ChIP Wash	Buffer	母液浓度	工作液浓度	For 5ml
	Tris-HCl(PH 8.0)	1M	20mM	100μl
	SDS	10%	0.10%	50μl
	Triton X-100	10%	1%	500μl
[0092]	EDTA	0.5M	2mM	20μl
	NaCl	5M	500mM	500μl
	PIC	25x	1x	200μl
	ddH ₂ O			3630μl
	Total			5000μl

[0093] (七) 洗脱

[0094] (1) 取出步骤(五)保存的Input DNA,加入Elution Buffer(表6)至体积达到200μl;步骤二:将步骤(六)中反复洗后离心只剩磁珠的IP样品中加入100μl Elution Buffer;

[0095] (2) 2种样品中都加入0.5μl 10μg/μl的RNase(包括Input的总DNA),68℃孵育2h,孵育期间可取出轻柔地混匀几次;

[0096] (3) 对于IP样品,4000rpm/2min离心,取上清到1.5ml离心管中;

[0097] (4) 离心下来的磁珠中再加100μl Elution Buffer重复洗脱,68℃孵育5min,4000rpm/2min离心,取上清至步骤(3)中的含有上清的离心管中,每个样品体积应在200μl左右;

[0098] 表6 Elution Buffer的组分及终浓度

Elution Buffer	母液浓度	工作液浓度	For 5ml
	NaHCO ₃	1M	100mM
[0099]	SDS	10%	1%
	ddH ₂ O		4000μl
	Total		5000μl

[0100] (八) DNA纯化

[0101] (1) 锁相离心管中加入步骤(七)洗脱后获得的100μl DNA和100μl ddH₂O,200μl的25:24:1(体积比)的苯酚-氯仿-异戊醇,颠倒混匀几次,4℃冷冻离心机最大转速离心5min;转移上层液体到新的1.5ml离心管中,加入500μl冰无水乙醇和20μl 3M NaOAc,震荡混匀,在-20℃冰箱放置孵育30min,4℃冷冻离心机最大转速离心20min;取上清并采用体积分数为70%的酒精清洗一遍,4℃冷冻离心机最大转速离心5min;弃去上清液,将EP管盖打开放在通风橱中风干半小时,然后加50μl ddH₂O溶解,-20℃保存。

[0102] 将步骤(八)纯化后的DNA进行ChIP-Seq,结果见图4,数据结果呈现很好的峰形,说明本发明制备的染色质质量很高。

[0103] 将ChIP-Seq获得的测序数据(65天猪胎儿背最长肌样品)进一步采用FastQC软件

进行质量评估,结果见图5~图10,进一步说明本发明制备的染色质质量很高。

[0104] 实施例2

[0105] (一)准备磁珠

[0106] (1)混合磁珠储存液制备具体方法同实施例1;

[0107] (2)混合磁珠储存液清洗具体方法同实施例1;

[0108] (3)在步骤(2)清洗后的混合磁珠中加入1ml IP Buffer,30μl的10mg/ml的单链三文鱼精子DNA,75μl的10mg/ml BSA溶液,2℃旋转混匀封闭4h(注:在封闭磁珠的4h内,可继续做核酸酶消化的步骤);然后4℃冷冻离心机4000rpm/2min离心,加入IP Buffer(表1)按照步骤(2)所述的方法再次继续清洗1次;最后用300μl的IP Buffer重悬混合磁珠,得到预处理混合磁珠溶液,储存在4℃直至需要;

[0109] (二)组织的研磨及微球菌核酸酶消化

[0110] (1)准备干净的研钵以及研磨棒;于研钵中加入液氮,取30mg猪的骨骼肌组织样品于研钵中,开始研磨直至组织样品被研成粉末;将粉末状的组织全部转移至干净的2ml离心管中;每份样品中加入250μl Douncing Buffer(DB)(表3),使用匀浆机(功率为125w,频率为50~60Hz)匀浆裂解2.5min;然后采用1ml移液器反复吹打30次进一步消化裂解,最后采用带针注射器(注射器规格1ml,针头的规格为25 5/8gauge)反复吸入和打出15次再次消化裂解,从而保证所有组织被完全消化裂解;其中,组织中脂肪比较多,匀浆机打不碎,匀浆裂解后如不采用移液器反复吹打,则很难用带针注射器反复吸入和打出,导致无法完全消化裂解;

[0111] (2)微球菌核酸酶消化:在消化裂解后的组织样品中加入10μl 100Units/μl的微球菌核酸酶(0.5μl微球菌核酸酶+9.5μl Buffer,注:可在第一次使用前将酶分装,避免反复冻融),36℃孵育10min;加入5μl 0.5M的EDTA(EDTA的终浓度是10mM),冰上孵育4min以终止反应;然后加入1ml的低渗裂解液(表2)后混匀,冰上孵育90min,每间隔10min简单地上下混匀一下;最后4℃冷冻离心机3000rpm/5min离心,上清液转移到新的1.5ml离心管中;

[0112] (三)苯酚抽提检测DNA大小

[0113] 具体方法同实施例1;

[0114] (四)预清除背景DNA

[0115] 取100μl步骤(一)制得的预处理混合磁珠溶液加入步骤(二)制得的剩余上清液中,然后2℃封闭旋转2.5h;4℃冷冻离心机4000rpm/2min离心,取上清液到1.5ml离心管中,得到预清除背景DNA的上清液;

[0116] (五)免疫沉淀、样品的清洗、洗脱、DNA纯化:具体方法同实施例1。

[0117] 实施例3

[0118] (一)准备磁珠

[0119] (1)混合磁珠储存液制备具体方法同实施例1;

[0120] (2)混合磁珠储存液清洗具体方法同实施例1;

[0121] (3)在步骤(2)清洗后的混合磁珠中加入1ml IP Buffer,30μl的10mg/ml的单链三文鱼精子DNA,75μl的10mg/ml BSA溶液,5℃旋转混匀封闭2h(注:在封闭磁珠的2h内,可继续做核酸酶消化的步骤);然后4℃冷冻离心机4000rpm/2min离心,加入IP Buffer(表1)按照步骤(2)所述的方法再次继续清洗1次;最后用300μl的IP Buffer重悬混合磁珠,得到预

处理混合磁珠溶液,储存在4℃直至需要;

[0122] (二)组织的研磨及微球菌核酸酶消化

[0123] (1)准备干净的研钵以及研磨棒;于研钵中加入液氮,取30mg猪的骨骼肌组织样品于研钵中,开始研磨直至组织样品被研成粉末;将粉末状的组织全部转移至干净的2ml离心管中;每份样品中加入250μl Douncing Buffer (DB) (表3),使用匀浆机(功率为125w,频率为50~60Hz)匀浆裂解2.5min;然后采用1ml移液器反复吹打15次进一步消化裂解,最后采用带针注射器(注射器规格1ml,针头的规格为25 5/8gauge)反复吸入和打出30次再次消化裂解,从而保证所有组织被完全消化裂解;其中,组织中脂肪比较多,匀浆机打不碎,匀浆裂解后如不采用移液器反复吹打,则很难用带针注射器反复吸入和打出,导致无法完全消化裂解;

[0124] (2)微球菌核酸酶消化:在消化裂解后的组织样品中加入10μl 100Units/μl的微球菌核酸酶(0.5μl微球菌核酸酶+9.5μl Buffer,注:可在第一次使用前将酶分装,避免反复冻融),38℃孵育6min;加入5μl 0.5M的EDTA (EDTA的终浓度是10mM),冰上孵育10min以终止反应;然后加入1ml的低渗裂解液(表2)后混匀,冰上孵育50min,每间隔10min简单地上下混匀一下;最后4℃冷冻离心机3000rpm/5min离心,上清液转移到新的1.5ml离心管中;

[0125] (三)苯酚抽提检测DNA大小

[0126] 具体方法同实施例1;

[0127] (四)预清除背景DNA

[0128] 取100μl步骤(一)制得的预处理混合磁珠溶液加入步骤(二)制得的剩余上清液中,然后5℃封闭旋转3h;4℃冷冻离心机4000rpm/2min离心,取上清液到1.5ml离心管中,得到预清除背景DNA的上清液;

[0129] (五)免疫沉淀、样品的清洗、洗脱、DNA纯化:具体方法同实施例1。

[0130] 对比实施例1

[0131] (一)准备磁珠:具体方法同实施例1;

[0132] (二)组织的研磨及微球菌核酸酶消化

[0133] (1)于研钵中加入液氮,取30mg猪的骨骼肌组织样品于研钵中,开始研磨直至组织样品被研成粉末;

[0134] (2)微球菌核酸酶消化:具体方法同实施例1;

[0135] (三)苯酚抽提检测DNA大小:具体方法同实施例1;

[0136] 检测结果见图1。

[0137] 对比实施例2

[0138] (一)准备磁珠:具体方法同实施例1;

[0139] (二)组织的研磨及微球菌核酸酶消化

[0140] (1)取30mg猪的骨骼肌组织样品于干净的2ml离心管中;每份样品中加入250μl Douncing Buffer (DB),使用匀浆机匀浆裂解2~3min;;

[0141] (2)微球菌核酸酶消化:具体方法同实施例1;

[0142] (三)苯酚抽提检测DNA大小:具体方法同实施例1;

[0143] 检测结果见图2。

[0144] 通过对猪体的表观遗传学研究来进行遗传改良一直是近年来的研究热点,而

ChIP-Seq正是表观遗传学研究的其中一项主要手段。传统研究是从猪体上获得相应细胞，而后在细胞水平上开展ChIP实验，该方法繁琐，耗时且对样品的质量要求极高，阻碍了表观遗传学研究的发展。因此，发明一种针对组织的染色质免疫沉淀处理方法是很关键的。而其问题就在于组织的处理，如何直接在组织水平获得量大且质量高的染色质是难点所在。

[0145] 本发明针对猪组织，采用Douncing Buffer和特殊研磨手段等，裂解猪骨骼肌组织，初步获得的组织悬液，在微链球菌核酸酶的消化下，获得了高产量的且质量高的染色质，从图1～图3的ChIP-DNA电泳对比图可以看出，在本发明的组织裂解和消化处理手段下，染色质的产量是极高的。而图4的IGV可视化分析结果说明，本发明最终获得的DNA进行ChIP-Seq，数据结果呈现很好的峰形，可以体现通过本发明所获得的染色质质量很高，通过本发明对组织进行处理，获得的ChIP-DNA后续进行ChIP-Seq是能够得到高质量的ChIP数据的(图5～图10)。

[0146] 上述实施例为本发明较佳的实施方式，但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制，其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化，均应为等效的置换方式，都包含在本发明的保护范围之内。

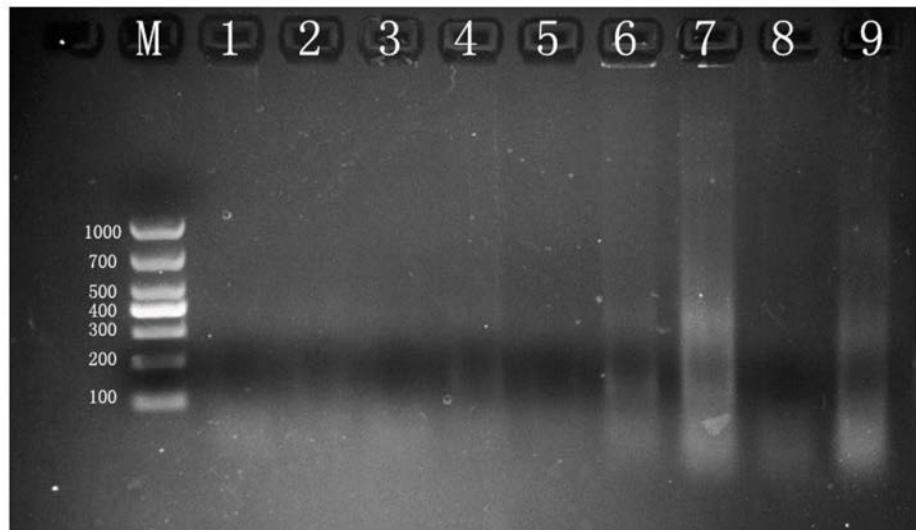


图1

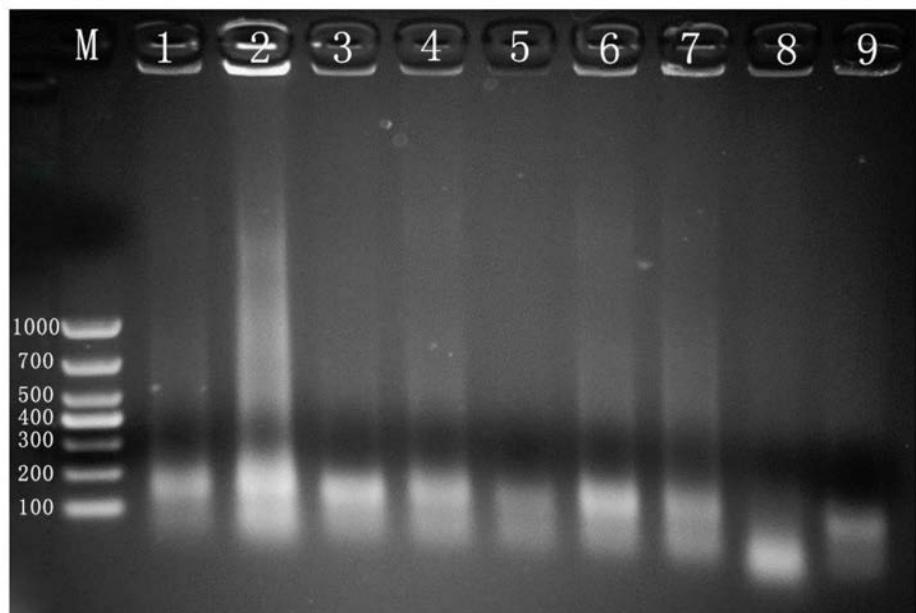


图2

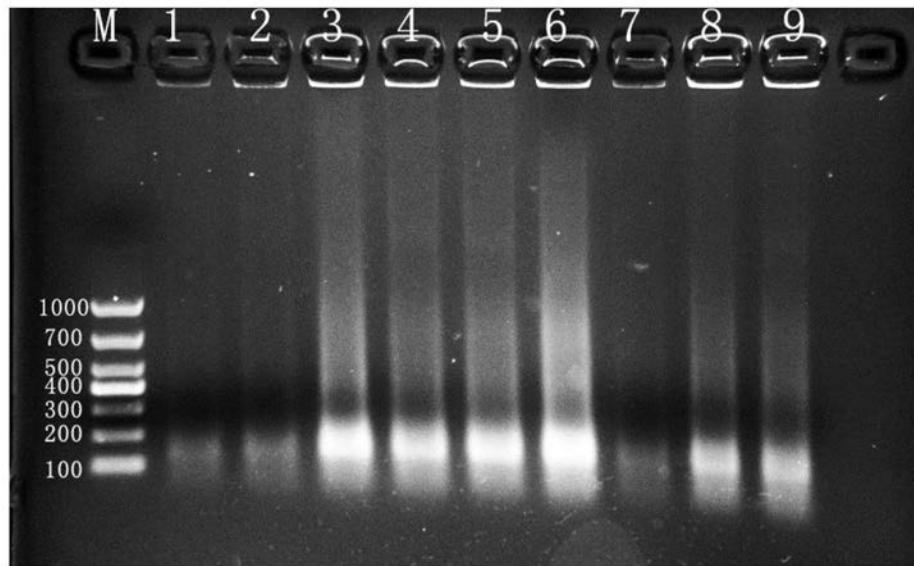


图3

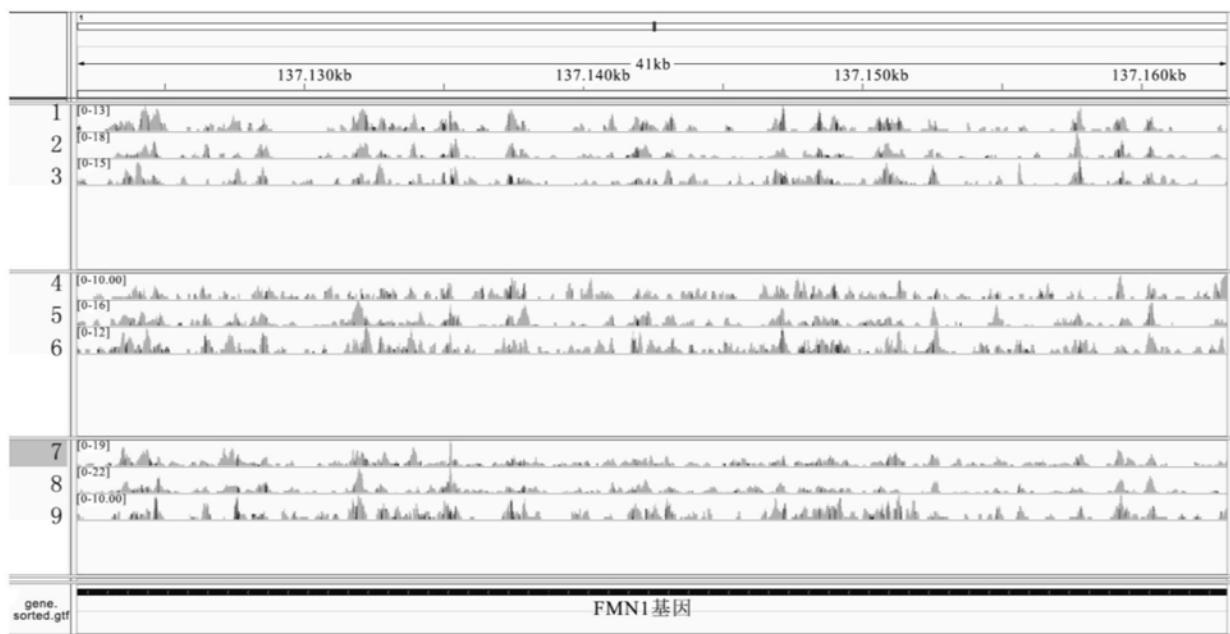


图4

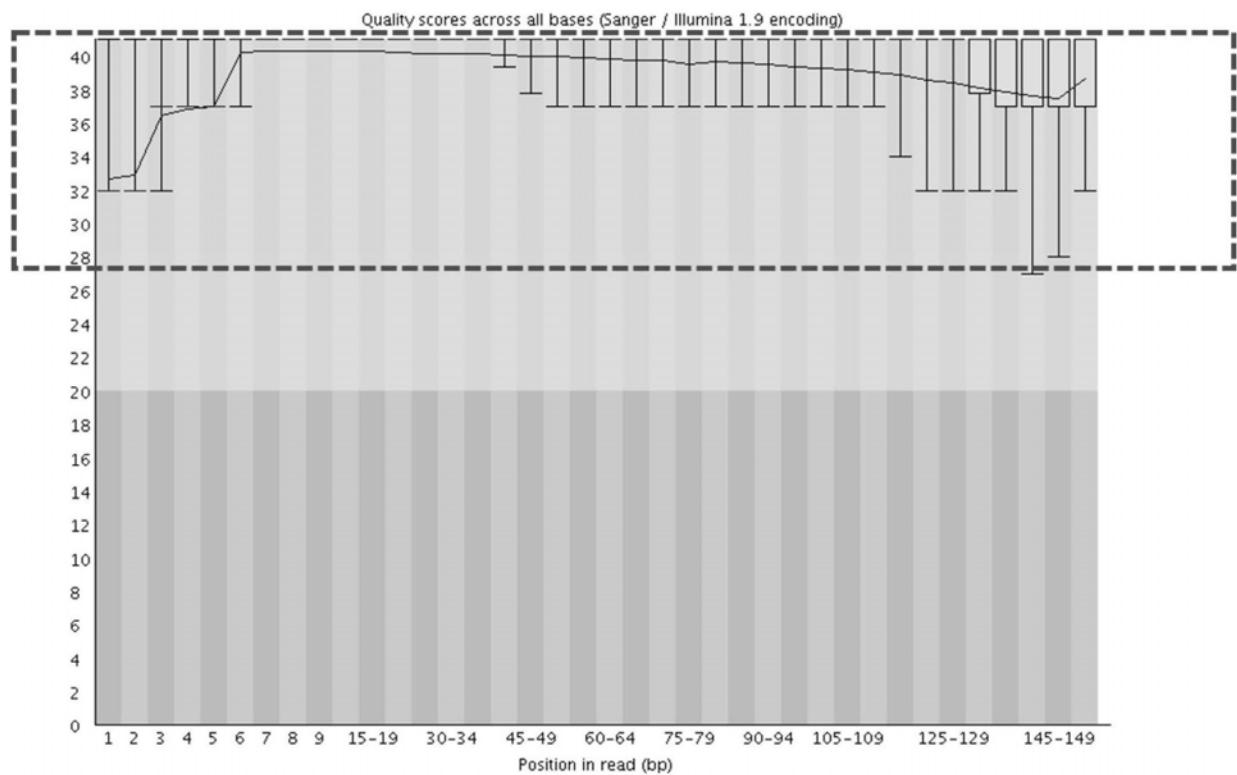


图5

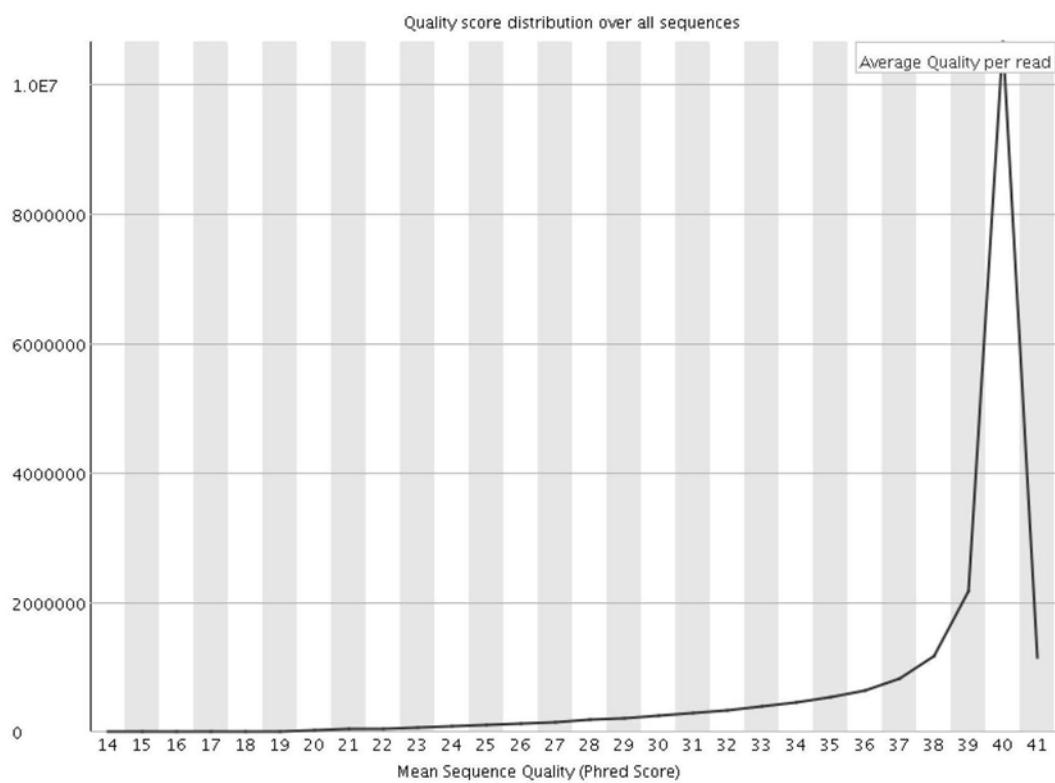


图6

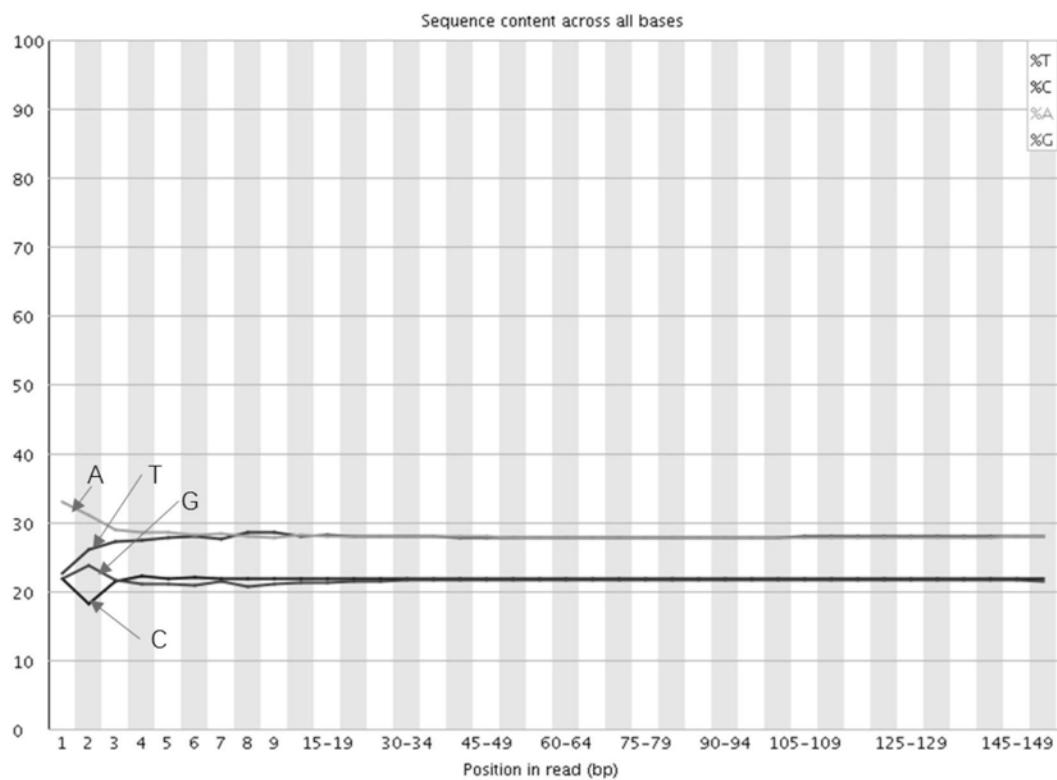


图7

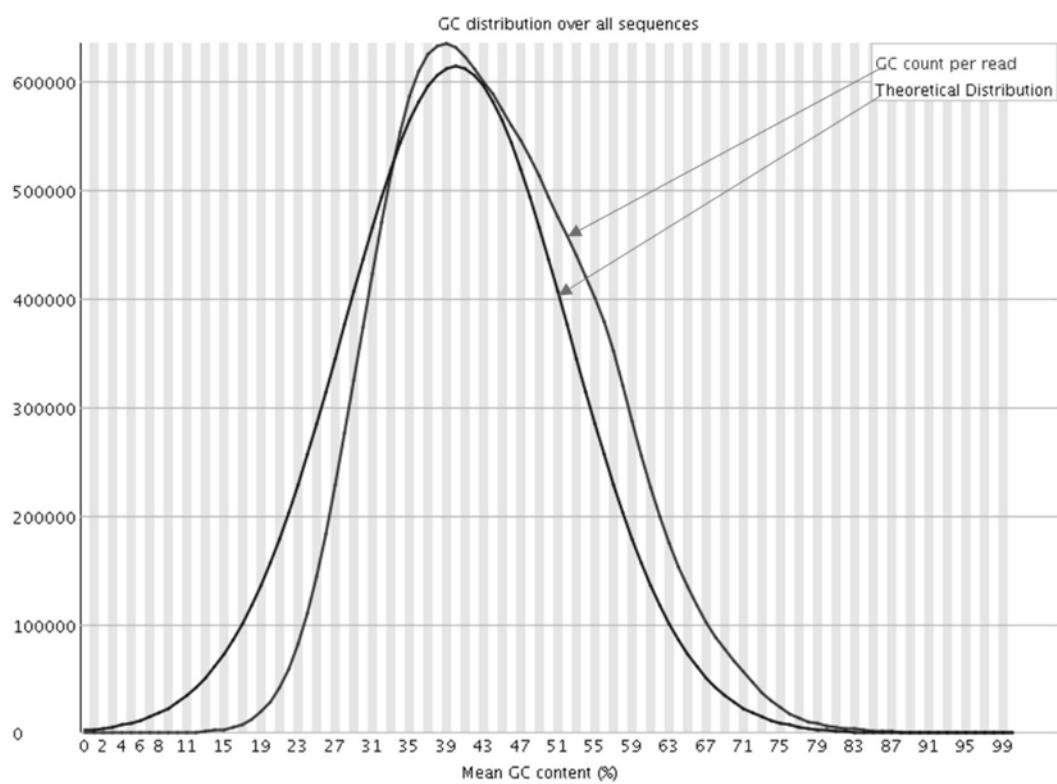


图8

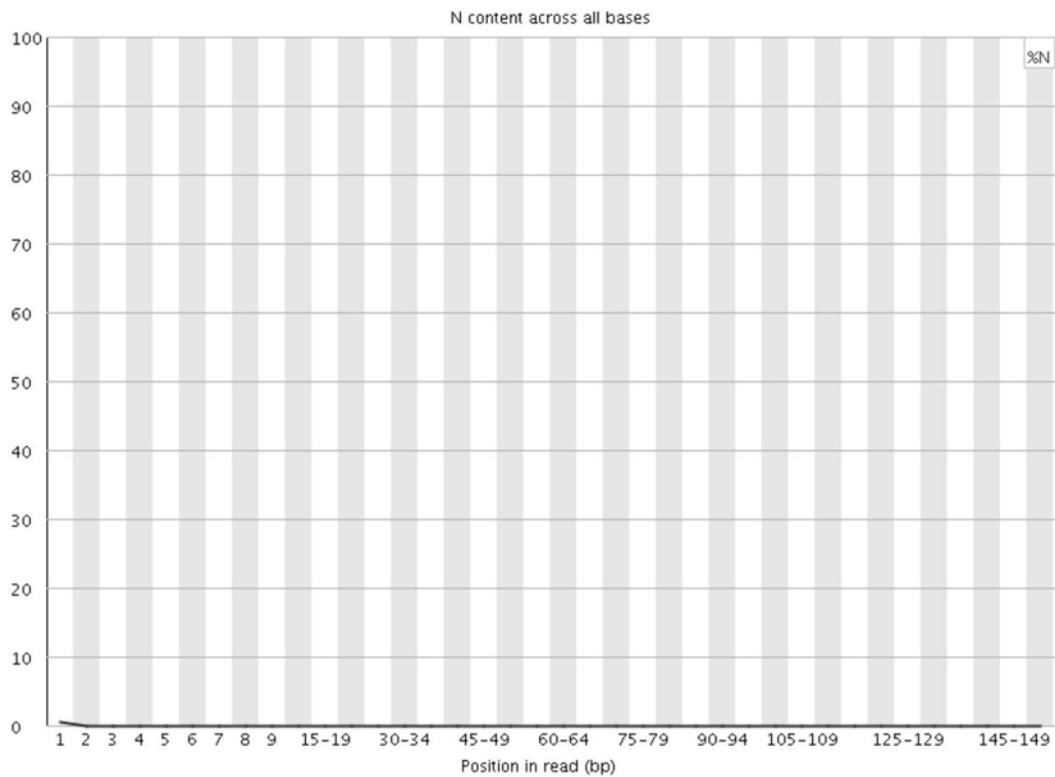


图9

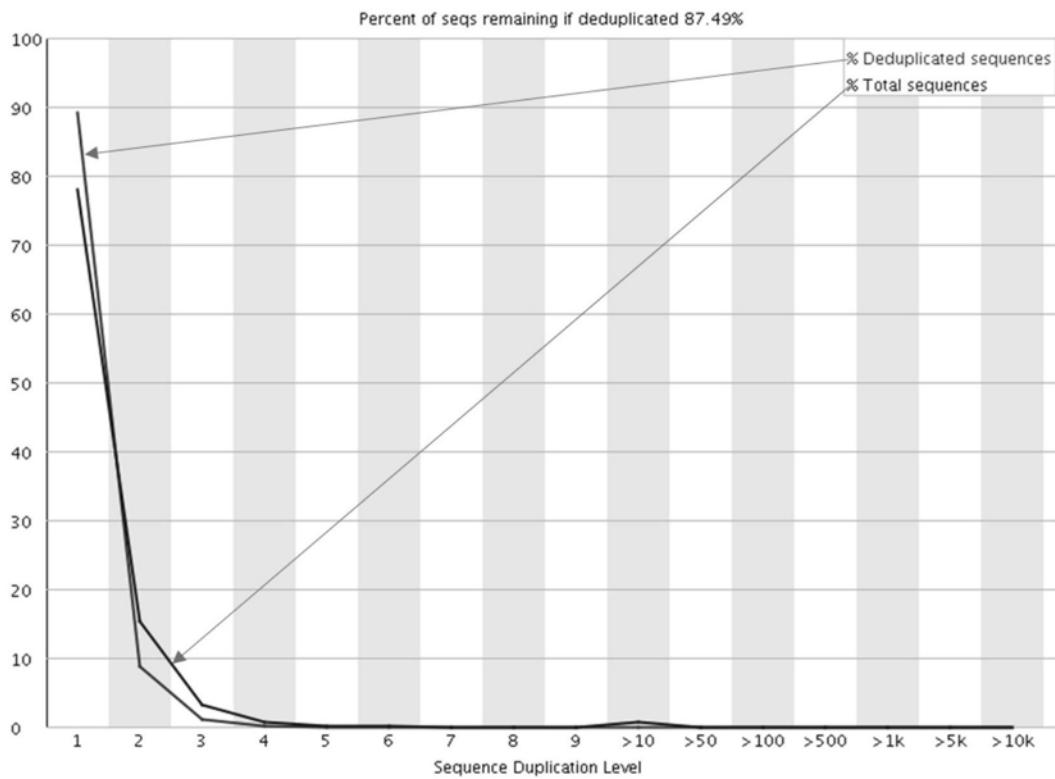


图10

专利名称(译)	一种针对组织的自然染色质免疫沉淀处理方法		
公开(公告)号	CN110320357A	公开(公告)日	2019-10-11
申请号	CN201910575929.X	申请日	2019-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	吴珍芳 顾婷 周健 邢萍萍 谭宝华 蔡更元 李紫聪 洪林君 杨杰 郑恩琴		
发明人	吴珍芳 顾婷 甘炎民 周健 邢萍萍 谭宝华 蔡更元 李紫聪 洪林君 杨杰 郑恩琴		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/54326		
代理人(译)	杨晓松		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明属于生物技术领域，具体涉及一种针对组织的自然染色质免疫沉淀处理方法。本发明采用Douncing Buffer和特殊研磨手段等方式裂解猪骨骼肌组织，初步获得组织悬液，在微链球菌核酸酶的消化下，获得了高产量的且质量高的染色质，然后采用磁珠吸附的方式去除背景DNA，得到预清除背景DNA的上清液；最后将预清除背景DNA的上清液进行免疫沉淀、样品清洗、洗脱、DNA纯化和检测，该方法获得的染色质的产量和质量很高，适用于肝脏、脑、肺和胎盘等组织以及哺乳动物早期胚胎细胞核的收集，利用该方法可以使完整细胞核的产量最大化。同时，该方法保持了染色质制备过程中抗体识别表位的完整性。

