

技术与方法

一种简便的染色质免疫沉淀法的建立*

傅湘辉 刘德培** 辛 立 郝德龙 董文吉 黄 粤 梁植权

(中国医学科学院 基础医学研究所, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)
(中国协和医科大学)

摘要 染色质结构和基因表达调节是当前国际前沿研究的热点。染色质免疫沉淀法是研究染色质结构的首选方法, 它不仅可用来研究体内反式因子与 DNA 的相互作用, 也可以用来研究组蛋白修饰与基因表达的关系。综合国外相关文献, 建立了一种简便的染色质免疫沉淀法, 并通过对诱导前后的 MEL 细胞中 β -珠蛋白基因簇组蛋白 H3 乙酰化的研究, 证实了其可操作性。结果表明: 高敏位点 HS2 和活跃基因 β maj 的启动子区域存在较高的组蛋白乙酰化水平, 且诱导前后变化显著, 而不活跃基因 Ey 的启动子区域则几乎检测不到组蛋白的乙酰化, 且诱导前后无明显变化。这一结果与以前的报道相吻合。

关键词 染色质, 染色质免疫沉淀法, MEL 细胞, 组蛋白乙酰化

学科分类号 Q78

基因表达是一个十分复杂而有序的过程, 它是众多的反式因子和顺式作用元件之间相互作用的结果。与原核生物不同, 真核生物的基因组 DNA 以染色质的形式存在。因此, 研究蛋白质与 DNA 在染色质环境下的相互作用是阐明真核基因表达机制的基本途径。一些方法, 如体内 DNA 足迹法等, 虽然可以用来检测体内 DNA-蛋白质的相互作用, 但都存在明显的不足^[1,2]。染色质免疫沉淀法 (chromatin immunoprecipitation assay, ChIP) 是研究体内 DNA-蛋白质相互作用的重要工具。它不仅灵敏地检测目标蛋白与特异 DNA 片段的结合情况, 还可以用来研究组蛋白与基因表达的关系。核小体组蛋白可以发生多种翻译后的共价修饰, 如乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化等, 这些共价修饰与真核基因的表达密切相关。根据“组蛋白密码” (histone code) 假说, 组蛋白的各种共价修饰的组合, 会以协同或拮抗的方式诱导特异的下游生物学功能^[3,4]。因此, ChIP 也为研究组蛋白修饰在基因表达中的作用, 全面阐明真核基因的表达调控机制提供了强有力的研究工具。

ChIP 的基本原理如图 1 所示, 其操作步骤可大致分为固定、沉淀和检测三步^[5~9]。第一步为固定, 即在活细胞状态下, 用甲醛固定蛋白质-DNA 复合物, 然后用化学 (微球菌酶) 或者机械 (超声波) 的手段将其随机切断为一定长度范围内的染色质小片段; 第二步为免疫沉淀, 即利用目的蛋白质的特异抗体通过抗原-抗体反应形成 DNA-蛋白质-

抗体复合体, 然后沉淀此复合体, 特异性地富集目的蛋白结合的 DNA 片段; 第三步为目的片段的纯化与检测, 即经过蛋白质与 DNA 解偶联, DNA 片段纯化等处理后, 用 PCR 方法检测 DNA 与蛋白质的结合情况。

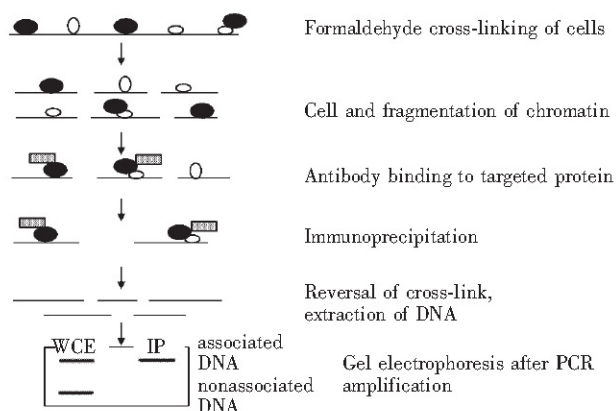


Fig.1 The schematic outline of ChIP

●: targeted protein; ○: non-targeted protein; ■: antibody; —: DNA; WCE: whole-cell extract; IP: immunoprecipitation.

大量研究表明: 组蛋白乙酰化水平与基因的表达密切相关, 活跃表达基因的启动子和增强子等调节区域呈现组蛋白的高乙酰化 (hyperacetylation),

* 国家自然科学基金资助项目 (30200158).

** 通讯联系人.

Tel: 010-65296426, Fax: 010-65133086

E-mail: liudp@95777.com

收稿日期: 2002-12-11, 接受日期: 2003-01-28

而沉默基因的相应区域则呈现组蛋白的低乙酰化(hypoacetylation)^[2,10]. 鼠源 β -珠蛋白基因簇是研究组蛋白乙酰化与基因活化关系的良好模型,它包括4个功能基因: Ey- β h1- β maj- β min. β -珠蛋白基因簇主要的调控区域基因座位控制区(locus control region, LCR)位于Ey-基因的上游,共包括7个高敏位点(HS1~7). 在正常的鼠红白血病(mouse erythroleukemia, MEL)细胞中, β maj基因呈现一定水平的表达,而Ey基因则不表达;在经过诱导后的MEL细胞中, β maj基因的表达量大大增加,而Ey基因仍然保持沉默^[11]. 为了研究组蛋白乙酰化与珠蛋白表达的关系,以及验证所建立的ChIP方法的准确性,我们在高敏位点HS2,不活跃基因Ey和活跃基因 β maj的启动子区域分别设计合成了3对PCR引物,对这3个区域的组蛋白H3乙酰化在诱导前后的MEL细胞中的变化情况进行了研究.

1 材料

1.1 仪器

Fisher Scientific 550 超声波粉碎仪.

1.2 试剂

苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、亮抑酶肽(leupetin)、胃蛋白酶抑制剂(pepstatin A)、脱氧胆酸钠、NP-40、玻璃珠购自Sigma公司. Triton X-100、Tris、蛋白酶K购自Roche公司. A蛋白胶体(protein A agarose)、乙酰化组蛋白H3抗体购自Upstate公司. Taq DNA聚合酶购自MBI公司. 其他试剂为国内产品. PCR引物由赛百盛公司合成. HS2 (279 bp): 正向引物 5' TTCCTACACATTAACGAGCCTCTGC 3', 反向引物 5' AACATCTGGCCACACACCCTAAGC 3'; Ey (291 bp): 正向引物 5' CAAAGAGAGTTTTT-GTTGAAGGAGGAG 3', 反向引物 5' AAAGTT-CACCATGATGGCAAGTCTGG 3'; β maj (269 bp): 正向引物 5' GACAAACATTATTTCAGAGGGAG-TACCC 3', 反向引物 5' AGGTGCACCATGATG-TCTGTTGCTGG 3'.

1.3 溶液配制

1.3.1 细胞裂解缓冲液: 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、10 mmol/L NaCl、0.2% NP-40, 室温保存. 使用前加入蛋白酶抑制剂(50 mg/L PMSF、1 mg/L leupetin、1 mg/L pepstatin A).

1.3.2 核裂解缓冲液: 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.1)、10 mmol/L EDTA、1% SDS, 室温保

存. 使用前加入蛋白酶抑制剂(50 mg/L PMSF、1 mg/L Leupetin、1 mg/L pepstatin A).

1.3.3 ChIP 稀释缓冲液: 0.01% SDS、1.1% Triton-X 100、1.2 mmol/L EDTA、16.7 mmol/L Tris-HCl (pH 8.1)、167 mmol/L NaCl, 室温保存. 使用前加入蛋白酶抑制剂(50 mg/L PMSF、1 mg/L Leupetin、1 mg/L pepstatin A).

1.3.4 低盐洗液: 0.1% SDS、1% Triton-X 100、2 mmol/L EDTA、20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.1)、150 mmol/L NaCl, 室温保存.

1.3.5 高盐洗液: 0.1% SDS、1% Triton-X100、2 mmol/L EDTA、20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.1)、500 mmol/L NaCl, 室温保存.

1.3.6 氯化锂洗液: 0.25 mol/L LiCl、1% NP-40、1%脱氧胆酸钠、1 mmol/L EDTA、10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.1), 室温保存.

1.3.7 ChIP 提取液: 1% SDS、0.1%碳酸氢钠, 新鲜配制.

2 方法

2.1 固定

MEL细胞在含有10%的胎牛血清1640培养基中,在37℃,5% CO₂的条件下培养数天. 在同样的培养条件下,加入1.5%的DMSO,培养4天,以诱导MEL细胞分化. 加入37%的甲醛到约含 2×10^7 个MEL细胞的培养基中至终浓度0.4%,室温轻微摇动10 min. 然后加入甘氨酸至终浓度0.125 mol/L,室温轻微摇动5 min,终止固定反应.

2.2 全细胞抽提物的获得

固定后的细胞2 000 r/min离心5 min后,用冷的PBS洗涤沉淀两次. 加入150 μ l细胞裂解缓冲液溶解沉淀,冰上放置10 min后,2 500 r/min,4℃离心5 min,去上清. 加入1 ml核裂解缓冲液溶解沉淀后,转移至另一个含0.4 g玻璃珠的离心管中,4℃,在涡混器上猛烈振荡3次,每次30 s. 冰上放置离心管,用超声波破碎仪断裂染色质6次,操作条件为最大输出量20%,时间20 s,每次超声波断裂的时间间隔为1 min. 超声波处理后,4℃,12 000 r/min离心15 min,取上清,即得到全细胞抽提物(whole-cell extract, WCE).

2.3 免疫沉淀

取200 μ l WCE,加入1 800 μ l ChIP稀释缓冲液,混匀. 加入80 μ l protein A agarose,4℃轻微

摇动 30 min 后, 2 000 r/min, 4℃ 离心 1 min. 小心转移上清至另一 2 ml 的离心管中, 加入 4 μ l 乙酰化组蛋白 H3 抗体, 4℃ 轻微摇动过夜后, 再加入 60 μ l protein A agarose, 4℃ 轻微摇动 1 h 后, 2 000 r/min, 4℃ 离心 1 min. 弃上清, 依次用 1 ml 的低盐洗液、高盐洗液、氯化锂洗液洗涤沉淀各 1 次, 每次轻微摇动 3~5 min, 4℃, 2 000 r/min 离心 1 min. 最后用 TE 洗涤沉淀 2 次, 每次轻微摇动 3~5 min, 4℃, 2 000 r/min 离心 1 min 后, 弃上清.

2.4 DNA 的分离及纯化

在上述所得的沉淀中, 加入 250 μ l 新鲜配制的 ChIP 提取液, 室温轻微摇动 15 min 后, 2 000 r/min, 4℃ 离心 1 min, 小心吸取上清至另一干净离心管中. 再加入 250 μ l ChIP 提取液, 重复上述操作一次, 合并两次所得的 ChIP 提取液 (约 500 μ l). 在所得的 ChIP 提取液和 Input 样品 (200 μ l WCE + 300 μ l ChIP 稀释缓冲液) 中, 分别加入 20 μ l 5 mol/L NaCl, 1 μ l RNase A (10 g/L), 混匀后, 65℃ 温育 5 h. 然后再加入 10 μ l 0.5 mol/L EDTA, 20 μ l 1 mol/L Tris-HCl (pH 6.5), 10 μ l 蛋白酶 K (10 mg/ml), 混匀后, 45℃ 温育过夜. 用等体积的酚: 氯仿: 异戊醇抽提 2 次后, 在上清中加入 2 μ l 糖元和 2 倍体积的无水乙醇, 混匀, -20℃ 放置 2 h 后, 于 4℃, 12 000 r/min 离心 15 min. 弃上清, 用 70% 乙醇洗涤沉淀 1 次, 晾干后, 溶于 40 μ l 灭菌水中.

2.5 PCR 反应

25 μ l 反应体系中含有 25 pmol 两种引物, 0.2 mmol/L dNTPs, 1 U Taq DNA 聚合酶, 5 μ l DNA 模板. 94℃ 变性 4 min 后, 再依下列条件在 PCR 仪上进行反应: 94℃ 变性 40 s, 62℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 50 s, 30 个循环后, 72℃ 保温 10 min. PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色后, 用 Kozak 1D Image 软件进行定量分析.

3 结果与讨论

3.1 超声波破碎条件

DNA 片段的大小对于 ChIP 的最后结果十分重要^[6]. DNA 片段越小, 越有利于区分染色质上结合有目的蛋白和未结合有目的蛋白的区域, 构建更加精细的图谱. 但是, DNA 片段过小会影响 PCR 扩增的效率. 因此, 恰当大小的 DNA 片段非常重要. 目前一般认为 500~1 000 bp 的大小范围

是比较合适的.

为得到合适大小的 DNA 片段, 我们摸索了各种超声波破碎条件, 最终确定了合适的超声波破碎条件 (图 2 中的第 6 泳道). 值得指出的是, 不同的超声波破碎仪、不同的细胞类型, 其合适的超声波破碎条件不同.

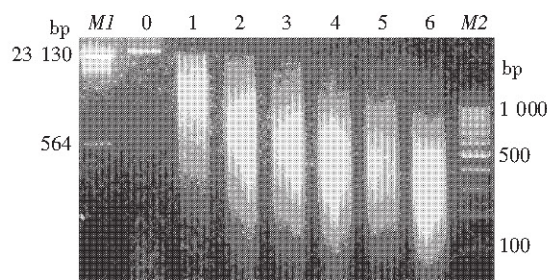


Fig. 2 Adjusting the size distribution of DNA fragments by sonication

Samples of the lysate were taken after the different times (0~6) of ultrasound pulses. DNA from each sample was purified and analyzed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel and ethidium staining. M1: λ DNA/HindIII DNA marker; M2: 100 bp DNA ladder marker.

3.2 抗体量的选择

抗体的多少与 ChIP 的准确度密切相关^[7]. 抗体量过少, 则特异蛋白沉淀不完全; 抗体量过多, 则可能会沉淀某些非特异蛋白. 合适的抗体量是刚好沉淀 WCE 中所有的特异蛋白. 经过反复试验, 我们选择 4 μ l 抗体用于本实验的研究 (结果未显示).

3.3 PCR 模板量的选择

DNA 印迹、PCR 方法均可用来进行 DNA 片段的分析^[6]. DNA 印迹方法准确度较高、但操作复杂. PCR 方法中, 既有常规的琼脂糖定量法, 又有同位素标记的定量法, 以及最新的 real-time PCR 定量法. 这些方法各有其优缺点. 琼脂糖定量法简单方便, 但准确性低; 同位素 PCR 法准确性虽有提高, 但操作不便; real-time PCR 法虽可做到实时定量, 准确性高, 但价格昂贵.

在本实验中, 我们采用常规的琼脂糖定量法. 在这一方法中, 模板量的选择尤其重要. 因为只有在适当的模板浓度下, PCR 产物才与加入模板量的多少呈现线性的正比关系. 经过摸索, 我们选择在 25 μ l 反应体系中分别加入免疫沉淀样品 (IP) 的 1/9 和对照样品 (Input) 的 1/120 进行 PCR 反应 (图 3), 获得了比较满意的结果.

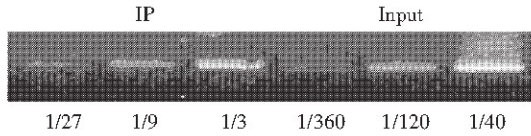


Fig. 3 PCR products obtained with HS2 primer and increasing amounts of template DNA from IP and input samples, respectively

The numbers indicate the percentage of template DNA used in the corresponding PCR reactions.

3.4 组蛋白 H3 乙酰化与珠蛋白基因表达

ChIP 分析结果表明: 在正常的 MEL 细胞中, HS2 和 β maj 的启动子区域存在较高的组蛋白 H3 乙酰化水平, IP/Input 的比例在 0.4 左右. 而 Ey 的启动子区域则几乎检测不到组蛋白 H3 的乙酰化 (图 4). MEL 细胞经过诱导后, HS2 和 β maj 的启动子区域的组蛋白 H3 乙酰化水平大增, IP/Input 的比例在 1.0 左右, 而 Ey 的启动子区域的乙酰化水平几乎没有变化. 这一结果说明组蛋白乙酰化可以作为基因表达活化的指标之一, 即基因越活化, 染色质结构越松散, 组蛋白乙酰化水平越高. 同时, 本实验结果也与以前所报道的结果相吻合^[12], 说明我们建立的 ChIP 方法是成功的.

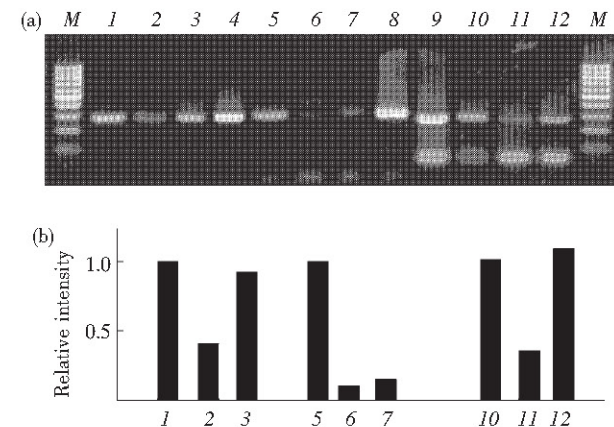


Fig. 4 Histone H3 acetylation pattern of the β -globin locus in MEL cells by ChIP analysis

(a) A representative ethidium bromide-stained agarose gel of PCR products. (b) The graphs show the relative intensity of the PCR products. M: 100 bp DNA ladder marker; 1: HS2 input; 2: HS2 IP before induction; 3: HS2 IP after induction; 4: HS2 control; 5: Ey input; 6: Ey IP before induction; 7: Ey IP after induction; 8: Ey control; 9: β maj control; 10: β maj input; 11: β maj IP before induction; 12: β maj IP after induction.

随着功能基因组研究的深入开展, 在染色质水平研究基因的表达调控是全面阐明真核基因表达调控机制的必经之路. ChIP 不仅可以检测体内反式因子与 DNA 的动态作用, 还可以用来研究组蛋白的各种共价修饰与基因表达的关系. 而且, ChIP 与其他方法的结合, 扩大了其应用范围. ChIP 与基因芯片相结合所建立的 ChIP-on-chip 方法已广泛用于特定反式因子靶基因的高通量筛选^[13~15]; ChIP 与体内足迹法相结合, 用于寻找反式因子的体内结合位点^[16]; RNA-ChIP 用于研究 RNA 在基因表达调控中的作用^[17]. 由此可见, 随着 ChIP 的进一步完善, 它必将会在基因表达调控研究中发挥越来越重要的作用.

参 考 文 献

- Hornstra I K, Yang T P. *In vivo* footprinting and genomic sequencing by ligation-mediated PCR. *Anal Biochem*, 1993, **213** (2): 179~193
- Xu D D, Liu D P, Ji X J, *et al.* *In vivo* DNA-protein interactions at hypersensitive site 3.5 of the human beta-globin locus control region. *Biochem Cell Biol*, 2001, **79** (6): 747~754
- Strahl B D, Allis C D. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 2000, **403** (6765): 41~45
- Jenuwein T, Allis C D. Translating the histone code. *Science*, 2001, **293** (5532): 1074~1080
- Orlando V, Strutt H, Paro R. Analysis of chromatin structure by *in vivo* formaldehyde cross-linking. *Methods*, 1997, **11** (2): 205~214
- Kuo M H, Allis C D. *In vivo* cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic protein-DNA associations in a chromatin environment. *Methods*, 1999, **19** (3): 425~433
- Hecht A, Grunstein M. Mapping DNA interaction sites of chromosomal proteins using immunoprecipitation and polymerase chain reaction. *Methods Enzymol*, 1999, **304**: 399~414
- Orlando V. Mapping chromosomal proteins *in vivo* by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci*, 2000, **25** (3): 99~104
- Johnson K D, Bresnick E H. Dissecting long-range transcriptional mechanisms by chromatin immunoprecipitation. *Methods*, 2002, **26** (1): 27~36
- Fu X H, Liu D P, Liang C C. Chromatin structure and transcriptional regulation of the beta-globin locus. *Exp Cell Res*, 2002, **278** (1): 1~11
- Frase P J, Curtis P J. Specific pattern of gene expression during induction of mouse erythroleukemia cells. *Genes Dev*, 1987, **1** (8): 855~861
- Forsberg E C, Downs K M, Christensen H M, *et al.* Developmentally dynamic histone acetylation pattern of a tissue-specific chromatin domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (26): 14494~14499
- Ren B, Robert F, Wyrick J J, *et al.* Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science*, 2000, **290** (5500): 2306~2309

- 14 Weinmann A S, Yan P S, Oberley M J, *et al.* Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis. *Genes Dev*, 2002, **16** (2): 235~244
- 15 Shannon M F, Rao S. Of chips and ChIPs. *Science*, 2002, **296** (5568): 666~669
- 16 Kang S H, Vieira K, Burgert J. Combining chromatin immunoprecipitation and DNA footprinting: a novel method to analyze protein-DNA interaction *in vivo*. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30** (10): e44
- 17 Niranjankumari S, Lasda E, Brazas R, *et al.* Reversible cross-linking combined with immunoprecipitation to study RNA-protein interactions *in vivo*. *Methods*, 2002, **26** (1): 182~190

A Simple Chromatin Immunoprecipitation Assay Protocol*

FU Xiang-Hui, LIU De-Pei**, XIN Li,

HAO De-Long, DONG Wen-Ji, HUANG Yue, LIANG Chih-Chuan

(National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences,
Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

Abstract Chromatin structure plays a critical role in eukaryotic gene expression. Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) provides a powerful tool to analyze the interaction of trans-acting factors with specific chromatin regions *in vivo*, as well as the role of histone modifications in gene regulation. A simple ChIP protocol is established and used to study the H3 acetylation pattern of the β -globin locus in MEL cells. DMSO induction results in a dramatic increase in H3 acetylation at hypersensitive site HS2 and active gene (β major) promoter, whereas the inactive gene (Ey) promoter maintains low acetylation. This result indicates that the ChIP method is feasible.

Key words chromatin, chromatin immunoprecipitation, MEL cell, histone acetylation

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30200158).

** Corresponding author. Tel: 86-10-65296426, Fax: 86-10-65133086, E-mail: liudp@95777.com

Received: December 11, 2002 Accepted: January 28, 2003