

# 长牡蛎(*Crassostrea gigas*)中 ChIP-seq 方法的建立\*

展望 王文 施威扬

(同济大学生命科学与技术学院 上海 200092)

**摘要** 染色质免疫共沉淀技术(ChIP)作为研究 DNA 结合蛋白与 DNA 相互作用最有力的工具, 越来越受到重视。但目前该技术在牡蛎等贝类中的应用尚未见相关报道。为了研究长牡蛎早期胚胎发育过程中表观遗传信息的变化模式, 本文在长牡蛎胚胎中探索并建立了一套完整的染色质免疫共沉淀方法, 构建了高质量的高通量测序文库, 首次获得了牡蛎全基因组水平的组蛋白 H3K4me3 修饰分布, 从而为研究牡蛎的表观遗传调控奠定了基础。

**关键词** 长牡蛎(*Crassostrea gigas*); ChIP-seq; 高通量测序; 组蛋白修饰

**中图分类号** Q81 **doi:** 10.11693/hyhz20150500141

长牡蛎又称太平洋牡蛎, 是我国最重要的海水养殖对象之一, 也是世界主要海水养殖贝类。培育高质量、高产的新品种一直是牡蛎养殖业的重要目标, 这使得牡蛎成为了研究最为深入的贝类之一(Qin *et al.*, 2012)。长牡蛎全基因组测序的完成(Zhang *et al.*, 2012), 为解密其遗传信息打开了大门, 并使其成为最主要的海洋贝类模式动物。通过对长牡蛎全基因组数据的分析, 已经初步揭示了一些其基因组的重要特性(Xu *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; She *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015), 但是更细致的组学功能研究还有待深入开展。本文通过在牡蛎中建立完整的染色质免疫共沉淀-测序技术(ChIP-seq), 在全基因组水平上获得了组蛋白修饰分布的信息, 并结合后期生物信息学分析, 初步阐释了牡蛎表观遗传修饰的特点。同时, 牡蛎中完整的 ChIP 技术的建立也可以更好地应用于转录因子或其它表观遗传修饰信息对发育的调控的研究, 从而为改良育种提供高效和正确的遗传信息。

通过 DNA 测序快速并准确获得各种生物体的遗传信息对生命科学研究具有重大意义, 而测序技术的进步极大推动了生物学的发展。测序技术最早可以追溯到 20 世纪 50 年代, Whitfeld 等(1954)报道了用化学降解的方法测定多聚核糖核苷酸序列; Sanger 等

(1975, 1977)发明的双脱氧核苷酸末端终止法和 Gilbert 等(Maxam *et al.*, 1977; Gilbert, 1981)发明的化学降解法, 标志着第一代测序技术的诞生。从此, DNA 测序走向了大规模实用化的道路。而高通量测序技术(high-throughput sequencing)的出现, 将生物学研究推向了新的高度。这些方法的应用和普及, 使人们能够更加全面地深入了解各种生物学过程, 以及如何在外界因素的影响下发生相应的动态变化(Pepke *et al.*, 2009)。

目前染色质免疫共沉淀技术(chromatin immunoprecipitation, ChIP)与测序(sequencing)相结合的 ChIP-seq 技术(Johnson *et al.*, 2007)是在基因组层次研究体内蛋白质与 DNA 相互作用的有力工具, ChIP-seq 技术能够高效地在全基因组范围内检测与组蛋白、转录因子等互作的 DNA 区段(Mikkelsen *et al.*, 2007; Robertson *et al.*, 2007)。ChIP-Seq 的原理是: 利用目的蛋白特异性的抗体通过免疫共沉淀对与目的蛋白结合的 DNA 片段进行特异性的富集, 然后进行下一步的 DNA 纯化与测序文库构建(Park, 2009; Chen *et al.*, 2012), 最后进行高通量测序。随后利用生物信息学软件将获得的数百万条序列定位到基因组上, 在全基因组范围内鉴别 DNA 结合蛋白结合位点、组蛋白修饰、核小体定位等信息。ChIP-seq 技术可以

\* 上海市浦江人才计划项目, 14PJ1408400 号; 同济大学 985 启动项目, 2000141505 号。展望, E-mail: 1234808\_zhanwang@tongji.edu.cn

通讯作者: 施威扬, 博士生导师, 研究员, E-mail: wshi@tongji.edu.cn

收稿日期: 2015-05-13, 收修改稿日期: 2015-08-19

应用到任何基因组序列已知的物种,通过测序完整揭示免疫沉淀富集的 DNA 片段包含的蛋白定位信息(Schuster, 2008)。近些年来,ChIP-seq 技术已经发展成为研究转录因子结合位点和组蛋白修饰的最有力的实验手段,而基于多种高通量测序平台的 ChIP-seq 在基因调控网络研究中也发挥着重要作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

长牡蛎(*Crassostrea gigas*)取自山东省青岛市胶南海水养殖场;挑选性腺饱满的一龄贝,镜检雄贝精子活力旺盛,雌贝卵子呈现梨形或者圆形;空运至上海后,随即放置在安装有增氧泵、水循环过滤系统以及水温控制冷却系统的人工海水水族箱内;人工海水盐度约 28—30,水温恒定在 16°C。

挑选出雌性和雄性牡蛎若干,解剖分离出精子和卵子,分别用海水漂洗 5—6 次,获得干净的卵细胞和精子。受精前,精子需要在海水中活化 10min 左右,卵细胞活化约 1h。向活化的卵细胞中添加精子,精子密度为 5—6 个精子包围 1 个卵子为宜。在水温 25°C,装有氧装置的培养箱中培养,保持搅拌(刘鹏超等, 2011)。加入精子后 30min 用 500 目滤网滤去精子,更换新鲜海水。显微镜观察胚胎发育同步性,对于在 4 细胞期发育同步性好的样品在培养箱中继续培养,收集 16 细胞期(约受精后 3h 10min, 25°C)胚胎样品; 1000r/min 离心 5min,用 2.9×室温 PBS 重悬后加入终浓度为 1%的甲醛室温下固定 10min。加入终浓度为 0.125mol/L 的甘氨酸终止反应 5min。1000r/min 4°C 离心 5min,弃上清;用 2.9×预冷的 PBS 重悬,再次离心后弃上清;用冷的 2.9×PBS 重悬后,分装至 EP 管中; 3000r/min 4°C 离心 1min,弃上清,液氮速冻, -80°C 冰箱保存。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 Western-Blot 验证 H3K4me3 抗体** 收集精子、16 细胞期胚胎和闭壳肌组织,加入适当体积的 RIPA 细胞裂解液(10mmol Tris-HCl, 1%脱氧胆酸钠, 1% NP-40, 150mmol NaCl, 0.1% SDS, 0.2mmol PMSF)裂解细胞,冰上裂解 30min 后,超声破碎细胞。最后,将裂解复合物 12000×g 离心 20min,吸取上清,弃沉淀, -80°C 冻存储备。含总蛋白为 20μg 的样品溶液加入 5×上样缓冲液, 100°C 沸水加热 5min。热变性后的样品进行浓度为 12%的 SDS-PAGE 电泳。湿法转膜(PVDF 膜, 0.22μm, Millipore) 100mA 恒流转膜 2h。5%

脱脂奶粉液室温封闭 1h 后,将滤膜与由 5%脱脂乳粉液稀释 1000 倍的第一抗体(rabbit-anti-H3K4me3, Millipore, 07-473) 4°C 孵育过夜,然后用 TBST(50mmol Tris, 150mmol NaCl, 0.05% Tween 20)漂洗 3 次,每次 10min。用 1 : 5000 稀释的辣根过氧化物酶标记的免疫球蛋白(Santa cruz)与滤膜温育,在摇床上摇动孵育 1h。然后用 TBST 漂洗 3 次,每次 10min。用 ECL 显色法(碧云天超敏 ECL 化学发光试剂盒)进行显色。

**1.2.2 胚胎的染色质免疫共沉淀(ChIP)** 取湿重约 1g 的固定的胚胎用膜裂解液(20mmol Tris, 85mmol KCl, 0.5% NP-40, 0.5%脱氧胆酸钠)裂解,高速离心收集细胞核。用 800μL 微球菌核酸酶缓冲液(10mmol Tris-HCl, 15mmol NaCl, 60mmol KCl, 2mmol CaCl<sub>2</sub>, 0.15mmol 精胺, 0.5mmol 亚精胺)重悬;加入 1000U 的微球菌核酸酶(micrococcal nuclease, NEB) 37°C 消化 10min; 期间每隔 2min 轻弹混匀一次;加入终浓度为 10mmol 的 EDTA 和终浓度 0.1% SDS 终止反应,置于冰上冷却;用 Bioruptor 进行超声;能量 H; 间隔 30s, 工作 30s, 时间 6—7min。14000r/min 4°C 离心 15min,收集上清。用 30kDa 超滤管(Amicon Ultra-0.5)将上清浓缩至体积约 100—200μL;取浓缩液体积的 1%作为 input,存放 -80°C;其余部分加入 800μL IP dilution buffer (2mmol EDTA, 150mmol NaCl, 20mmol Tris-HCl);加入约 5μg ChIP 抗体(rabbit-anti-H3K4me3, Millipore, 07-473)和 Dynabeads Protein A/Protein G 混合均匀,在 4°C 孵育过夜。次日分别 TS 液(0.1% SDS, 1% TritonX-100, 2mmol EDTA, 20mmol Tris-HCl, 150mmol NaCl)、TS 液(0.1% SDS, 1% TritonX-100, 2mmol EDTA, 20mmol Tris-HCl, 500mmol NaCl)、Buffer 液(0.25mol/L LiCl, 1% NP-40, 1%脱氧胆酸钠, 1mmol EDTA, 10mmol Tris-HCl)、TE 各洗 3 次,每次 5min;洗涤完成后弃上清;加入 IP 洗脱液(1% SDS, 0.1mol/L NaHCO<sub>3</sub>) 200μL,放置在 65°C 金属浴振荡 1h;加入 RNase A 去除 RNA;加入蛋白酶 K、NaCl 置于 65°C 解交联过夜。用酚氯仿法抽提-乙醇沉淀纯化 DNA, TE 溶解 DNA 后随即构建文库。

**1.2.3 构建文库** 取 input DNA(1μg)和 ChIP DNA,按照 NEBNext DNA 超快速文库制备试剂盒(E7370S)的说明书指示制备测序文库。文库构建成功后送往华大基因公司进行 PE 50 双端测序。

**1.2.4 数据分析** 使用 bowtie(version 1.0.1)将测序读长回贴到牡蛎的基因组(从 <http://oysterdb.cn/> 下载)上,参数设置为比对时种子长度为 28bp,最多允许 2 个错配的默认值。对回贴所得的结果 BAM 文件

用 MACS(1.4.2 20120305)以默认参数进行处理。对 MACS 所得结果使用 CEAS (Package Version 1.0.2)进行处理, 所用的 Gene 信息为从 <http://oysterdb.cn/> 下载后转换格式所得。

## 2 实验结果

### 2.1 抗体验证

ChIP 实验的成功首先需要能够在所实验的物种中工作, 且特异性较好的抗体; 但由于牡蛎是一个比较新的模式动物, 基本上所有商品化的抗体都没有在牡蛎中验证抗体有效性的资料; 为了验证本实验所用抗体的有效性, 作者收集了牡蛎精子、胚胎(16 细胞)以及闭壳肌三种样品, 采用 Western-Blot 的方法验证所用的 H3K4me3 抗体在牡蛎中工作效果。图 1 中显示在精子、胚胎和肌肉中都能检测到信号, 且条带较为特异, 没有其它干扰条带; 但从图 1 中可以发现在精子中 H3K4me3 的信号较弱, 暗示精子中可能缺少组蛋白的修饰。因为 H3K4 甲基化通常被认为是基因的活化信号, 如 H3K4me3 在转录起始位点的富集通常表明着基因的转录激活(Li *et al*, 2007)。综合三种样品中的实验结果表明本研究所选的抗体能够应用于牡蛎中, 而且识别 H3K4me3 比较特异, 可以用于下一步的 ChIP 实验。

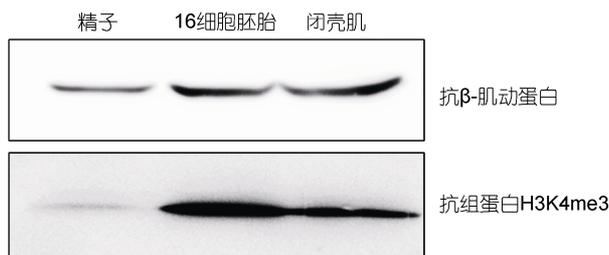


图 1 牡蛎中 H3K4me3 抗体验证

Fig.1 Verification of anti-H3K4me3 antibody in the oyster

### 2.2 ChIP-seq 文库构建结果

早期胚胎细胞分裂活动旺盛, 染色质较为疏松, 而且含有大量的细胞质, 若使用传统的超声方法制备染色质, 裂解液中会溶解大量的细胞质蛋白, 对后一步免疫沉淀过程产生影响。因此, 针对早期胚胎的结构特点, 作者利用微球菌核酸酶(Micrococcal Nuclease)将染色质酶切成单核小体。

作者前期摸索了不同时间梯度下酶切的效果, 以加入酶为零点, 分别在 0、5、10、20、30 和 40min 取等量的反应液, 经过解交联纯化 DNA 后电泳; 如

图 2a 显示, 随着酶切时间的延长, 所获得的核小体从起始点呈现阶梯状分布逐渐到 40min 时候大部分可见的单核小体(150bp)状态; 酶切 40min 后, 绝大部分染色质已经变成单核小体甚至更小的片段; 根据上述条件, 最终确定酶切 10min 使得染色质绝大部分是单核小体(150bp), 但双核小体(300bp)依然可见(图 2b 所示)。

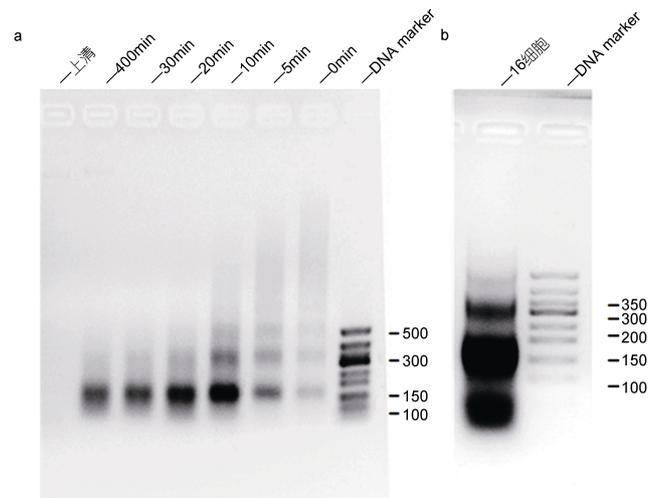


图 2 不同时间点酶切效果检测

Fig.2 The effect of enzyme digestion in time series

a: 16 细胞期胚胎在不同时间下酶切片段大小; b: 16 细胞时期胚胎酶切 10min 条带

随后将按照上述条件制备的 DNA-组蛋白复合物经 ChIP 后纯化 DNA, 使用 NEBNext DNA 超快速文库制备试剂盒构建文库。通常来讲, ChIP-seq 对样品的要求是 DNA 总量大于 10ng 以上, 片段主峰分布在 100—500bp 之间。使用 Agilent 2100 检测构建成功的测序文库的实际分布和浓度(图 3); 其中主峰片段大小为 279bp, 浓度为 17.5 nmol/L, 符合上机测序要求; 将样本交于华大基因公司测序, 测序完成后返回原始数据, 进行数据的处理。

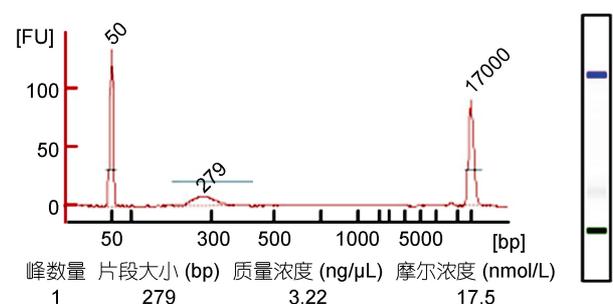


图 3 使用 Agilent 2100 分析 ChIP-seq 文库结果

Fig.3 Agilent 2100 analysis of ChIP-seq library using MNase digestion

### 2.3 ChIP-seq 结果分析

为了进一步检验按照本文描述的方法所构建的文库, 将所测的数据首先利用数据质控软件 FastQC 进行测序数据的质量控制; FastQC 通过分析原始数据的每一个碱基来显示整体样品的测序质量。图 4 中选取展示了 FastQC 结果中的 4 条结果, a 图中全部 reads 的评分均在 30 以上, 说明测序结果偏差较小; b 图中统计了全部 reads 的 CG 分布比较均一; 仅在 5' 端出现由于机器导致的偏差; c 图中表明测序结果中表示测序结果中不能分辨的碱基 N 的比例很小; d 图表明了测序结果中的重复序列出现的次数较低; 结果显示利用本文的 ChIP 方法所获得的数据质量比较好, 可以用于下一步的分析。

所得数据 reads 总数为 17885715, reads 双端比对到基因组上的数量为 8258488, 比对效率 46.17%。这和其它物种中 ChIP-seq 实验的一般比对效率(40%—

70%)近似(Park, 2009; Wei *et al.*, 2013)。接下来使用 CEAS 软件(Ji *et al.*, 2006)对 ChIP-Seq 数据的初步分析, 图 5a 显示相对于全基因组, ChIP-seq 实验组在基因组上富集于启动子区域, 同时在转录起始位点(TSS)有一个峰的集中分布(图 5b), 从而可以确定 ChIP-Seq 实验是成功的。后续工作开始对这些富集峰进行准确的注释, 以了解更多信息。

### 3 讨论

目前染色质免疫共沉淀技术(ChIP)与测序(sequencing)相结合的 ChIP-seq 技术是在基因组层次研究体内蛋白质与 DNA 相互作用的有力工具, 能够高效地在全基因组范围内检测与组蛋白、转录因子等互作的 DNA 区段。然而目前在牡蛎等贝类中尚未见相关报道。

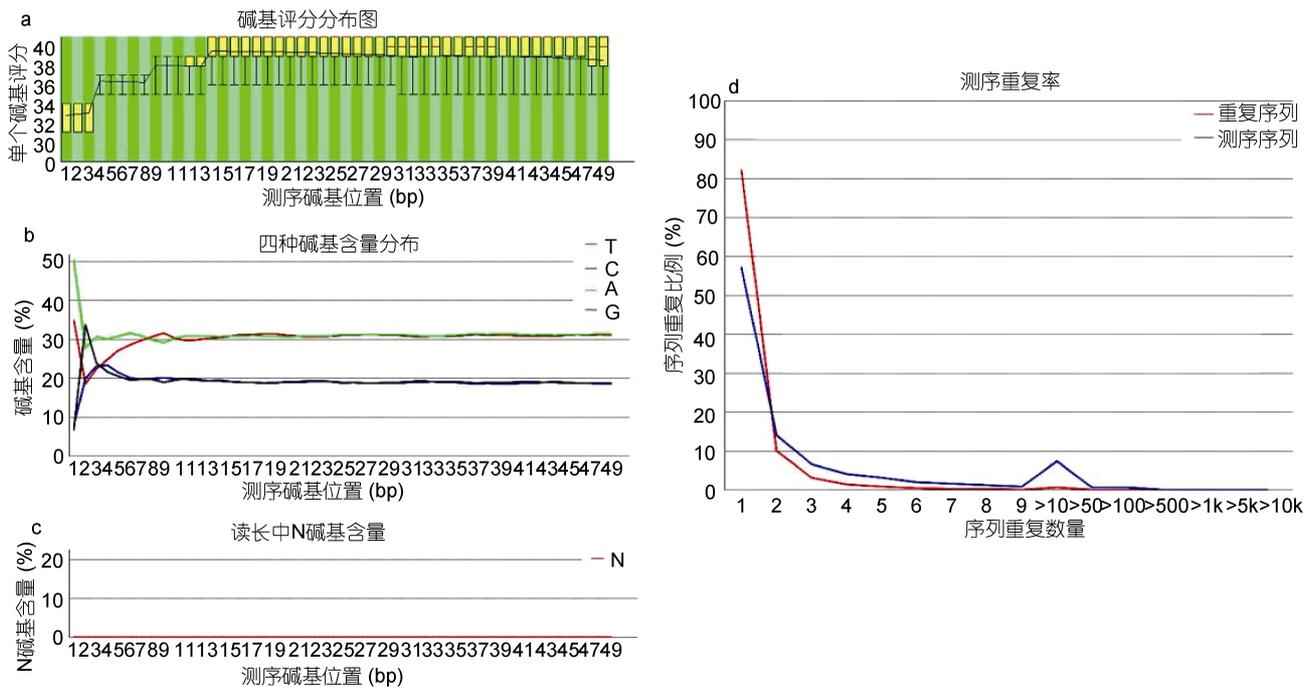


图 4 FastQC 质控结果

Fig.4 Result of quality control with FastQC

a. 单个碱基序列质量 b. CG 含量统计 c. 测序结果为 N 碱基统计 d. 序列重复次数

进行 ChIP 实验的关键因素是特异性的抗体和高质量的染色质制备。作者尝试了可以广泛识别真核生物保守度 H3K4me3 修饰的抗体并证实其可以用于 ChIP。在染色质制备上面, 尝试了超声和酶切消化两种方法。超声有重复性差、需要样品多等劣势, 根据牡蛎胚胎的细胞性质, 采用了微球菌核酸酶消化的

方式制备了高质量的单核小体染色质。此外, 为了获得发育同步性高度早期胚胎, 通过缩短受精时间和洗除精子等方法, 收集了发育同步性较高的早期胚胎; 探索出了一套稳定性好、重复性高而且对于各个时期的胚胎都适宜的 ChIP 方法; 最后, 将制备的 ChIP 样品在实验室自行建库, 克服了商业化公司构

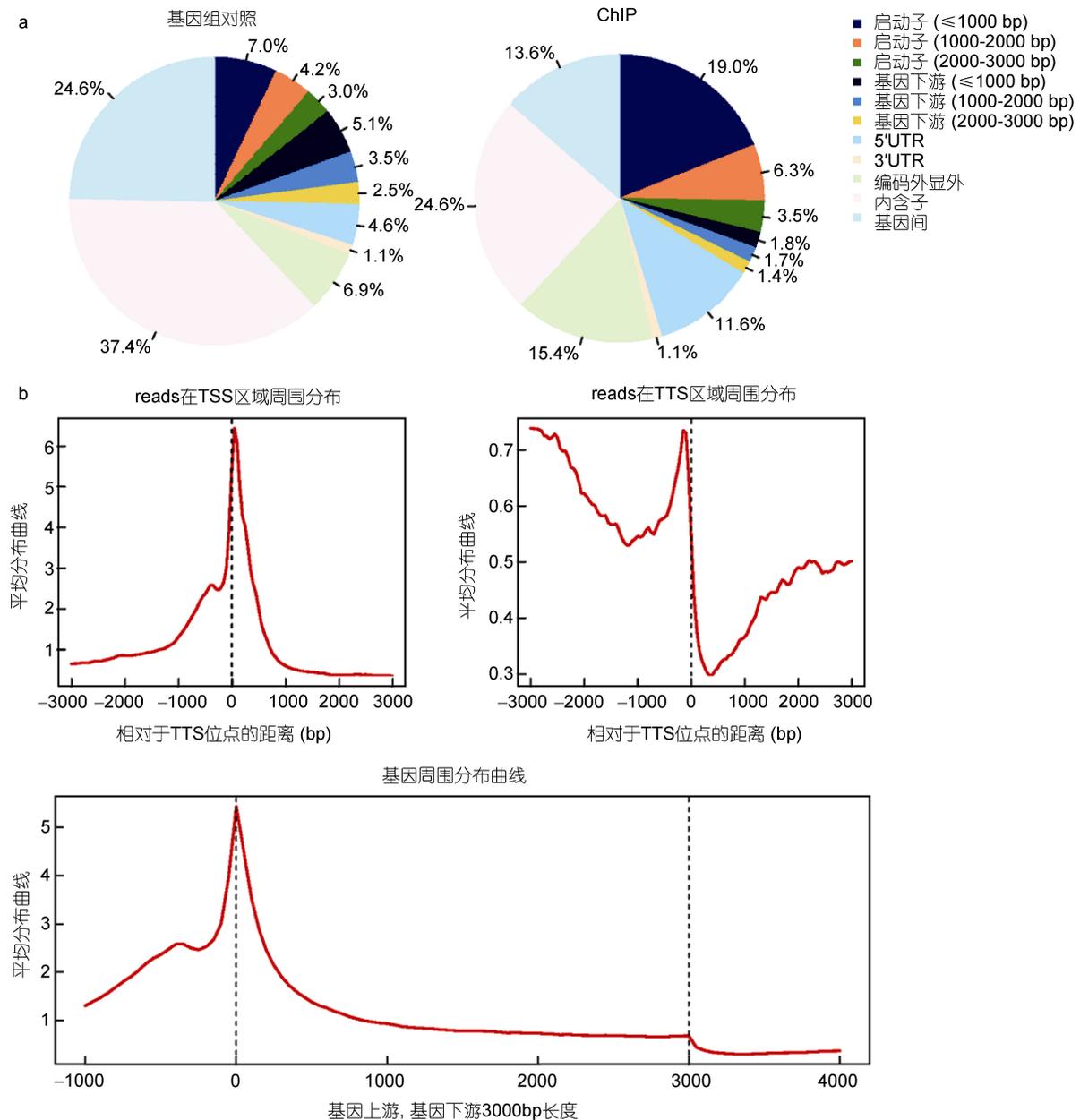


图 5 CEAS 分析结果

Fig.5 Results of analysis with CEAS

- a. 相对于全基因组, TSS 上游 3kb 的区域占总基因组的 14.2%, 而 ChIP 数据则有 28.8%富集在此区域;  
b. reads 在基因组上主要分布在 TSS 区域

建文库成本高、风险大等因素。测序结果说明在文库质量、基因组比对效率等方面都和模式生物中的 ChIP-seq 结果类似, 说明作者建立的牡蛎 ChIP-seq 试验体系可以用于研究组蛋白的表观遗传修饰。本研究的结果显示与其它模式生物类似, 牡蛎的 H3K4me3 修饰主要分布在基因转录起始位点附近, 具体的基因数据需要进一步的分析处理。这些信息可以为揭示牡蛎胚胎发育的表观遗传调控机制、解析基因调控网络提供巨大帮助。

#### 4 结语

将 ChIP 应用于一种新的动物系统是很大的挑战, 物种特异的实验步骤及实验方案的设计都少有前人工作可以参考。以牡蛎为样品的表观遗传方法的建立可以为牡蛎中的多种研究奠定方法学基础。本文的结果证实了在牡蛎中进行 ChIP 实验的可行性, 并且揭示了在牡蛎早期配套中存在着广泛的组蛋白 H3K4me3 的修饰, 这一技术也可以更好地应用于研

究转录因子或其它表观遗传修饰的信息,并为改良育种提供高效和正确的遗传信息。作为第一个完成基因组测序的经济贝类动物,对其进行多方面的组学研究,势必有助于了解海洋中种类最丰富、但研究甚少的海洋生物。

### 参 考 文 献

- 刘鹏超, 阙华勇, 张国范, 2011. 长牡蛎早期胚胎发育中脂肪酸和氨基酸组成变化的研究. 海洋科学, 35(10): 16—21
- Chen Y W, Negre N, Li Q H *et al*, 2012. Systematic evaluation of factors influencing ChIP-seq fidelity. *Nat Methods*, 9(6): 609—614
- Gilbert W, 1981. DNA sequencing and gene structure. *Science*, 214(4527): 1305—1312
- Ji X W, Li W, Song J *et al*, 2006. CEAS: *cis*-regulatory element annotation system. *Nucleic Acids Res*, 34(S2): W551—W554, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkl322>
- Johnson D S, Mortazavi A, Myers R M *et al*, 2007. Genome-wide mapping of *in vivo* protein-DNA interactions. *Science*, 316(5830): 1497—1502
- Li B, Carey M, Workman J L, 2007. The role of chromatin during transcription. *Cell*, 128(4): 707—719
- Li H, Zhang H, Jiang S *et al*, 2015. A single-CRD C-type lectin from oyster *Crassostrea gigas* mediates immune recognition and pathogen elimination with a potential role in the activation of complement system. *Fish Shellfish Immunol*, 44(2): 566—575
- Maxam A, Gilbert W, 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(2): 560—564
- Mikkelsen T S, Ku M, Jaffe D B *et al*, 2007. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*, 448(7153): 553—560
- Park P J, 2009. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nat Rev Genet*, 10(10): 669—680
- Pepke S, Wold B, Mortazavi A, 2009. Computation for ChIP-seq and RNA-seq studies. *Nat Methods*, 6(11S): S22—S32, doi: 10.1038/nmeth.1371
- Qin J, Huang Z X, Chen J *et al*, 2012. Sequencing and de novo analysis of *Crassostrea angulata* (Fujian oyster) from 8 different developing phases using 454 GSFLx. *PLoS One*, 7(8): e43653, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0043653>
- Robertson G, Hirst M, Bainbridge M *et al*, 2007. Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing. *Nat Methods*, 4(8): 651—657
- Sanger F, Coulson A R, 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*, 94(3): 441—448
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A R, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12): 5463—5467
- Schuster S C, 2008. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat Methods*, 5(1): 16—18
- She Z C, Li L, Qi H G *et al*, 2015. Candidate gene polymorphisms and their association with glycogen content in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS One*, 10(5): e124401, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0124401>
- Wei Y, Chen R, Dimicoli S *et al*, 2013. Global H3K4me3 genome mapping reveals alterations of innate immunity signaling and overexpression of JMJD3 in human myelodysplastic syndrome CD34+ cells. *Leukemia*, 27(11): 2177—2186
- Whitfield P R, 1954. A method for the determination of nucleotide sequence in polyribonucleotides. *Biochem J*, 58(3): 390—396
- Xu F, Wang X T, Feng Y *et al*, 2014. Identification of conserved and novel microRNAs in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* by deep sequencing. *PLoS One*, 9(8): e104371, <http://doi:10.1371/journal.pone.0104371>
- Zhang G F, Fang X D, Guo X M *et al*, 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 490(7418): 49—54
- Zhang L L, Li L, Guo X M *et al*, 2015. Massive expansion and functional divergence of innate immune genes in a protostome. *Sci Rep*, 5: Article number: 8693
- Zhou Z, Wang L L, Song L S *et al*, 2014. The identification and characteristics of immune-related microRNAs in haemocytes of oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS One*, 9(2): e88397

## DEVELOPMENT OF A ChIP-seq METHOD IN *CRASSOSTREA GIGAS*

ZHAN Wang, WANG Wen, SHI Wei-Yang

(School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

**Abstract** Chromatin immunoprecipitation coupled with high throughput sequencing (ChIP-seq) is a powerful tool to analyze DNA-protein interactions. However, the application of ChIP-seq in *Crassostrea gigas* has not been investigated. In this study, we established a protocol for performing ChIP-seq experiment in oyster early embryos. We successfully performed H3K4me3 ChIP-seq on 16-cell stage oyster embryo and revealed the genome-wide distribution of the H3K4me3 histone marks. This study is the first step toward understanding the epigenetic regulation of oyster embryogenesis.

**Key words** *Crassostrea gigas*; ChIP-seq; high-throughput sequencing; histone modification

## 附录: 胚胎的染色质免疫共沉淀

1. 取约1g的固定的胚胎用10mL膜裂解液(20mmol Tris, 85mmol KCl, 0.5% NP-40, 0.5% 脱氧胆酸钠)重悬, 用注射器针头破碎胚胎4000r/min, 4°C离心15min, 去除上清;
2. 用2mL微球菌核酸酶缓冲液(10mmol Tris-HCl, 15mmol NaCl, 60mmol KCl, 2mmol CaCl<sub>2</sub>, 0.15mmol精胺, 0.5mmol亚精胺)重悬沉淀; 然后等体积分成2份至1.5mL EP管中; 7000r/min, 4°C离心10min; 弃上清;
3. 用800μL微球菌核酸酶缓冲液重悬沉淀; 加入1000U的Micrococcal Nuclease, 37°C消化10min; 期间每隔2min混匀一次;
4. 每个反应管中加入终浓度为10mmol的EDTA终止反应; 加入终浓度0.1% SDS, 置于冰上冷却;
5. 用Bioruptor进行超声, 能量H, 间隔30s, 工作30s, 时间6—7min;
6. 14000r/min, 4°C离心15min, 收集上清后转移至新的EP管; 再次14000r/min, 4°C离心15min, 收集上清;
7. 取1%体积上清为input, 剩余上清加入9倍体积IP dilution buffer (2mmol EDTA, 150mmol NaCl, 20mmol Tris-HCl, 1% TritonX-100), 加入约5μg ChIP抗体, 在4°C旋转过夜;
8. 第二日取Protein A/Protein G磁珠各25μL混合; 用新鲜配制的5% BSA/PBS洗涤磁珠三次;
9. 用100μL 5% BSA/PBS悬浮磁珠, 加入至步骤8中的溶液中, 在4°C中旋转3—4h;
10. 取出步骤10的样品溶液, 短暂离心后置于磁力架上去除上清; 依次分别用以下溶液洗涤:  
TS 液(0.1% SDS, 1% TritonX-100, 2mmol EDTA, 20mmol Tris-HCl, 150mmol NaCl) 1mL洗2次;  
TS 液(0.1% SDS, 1% TritonX-100, 2mmol EDTA, 20mmol Tris-HCl, 500mmol NaCl) 1mL洗3次;  
Buffer 液(0.25mol/L LiCl, 1% NP-40, 1%脱氧胆酸钠, 1mmol EDTA, 10mmol Tris-HCl) 1mL洗3次TE液 1mL洗3次;
11. 洗涤完成后将溶液置于磁力架上, 弃上清; 加入IP elution buffer (1% SDS, 0.1mol/L NaHCO<sub>3</sub>) 200μL, 剧烈混匀, 放置在金属浴65°C振荡1h;
12. 12000r/min室温离心3min, 将EP管放置磁力架上, 收集上清;
13. 取出input管, 加IP洗脱液补足至200μL; 在ChIP DNA和input管中分别加入8μL 5mol/L NaCl, 65°C水浴解交联3h;
14. 冷却至室温, 加入1μL RNase A 37°C处理30min;
15. 加入3μL蛋白酶K 55°C处理2h; 65°C水浴完全解交联过夜;
16. 酚氯仿抽提2次, 加入2.5倍体积的无水乙醇, 1/10体积的醋酸钠, -20°C沉淀过夜;
17. 14000r/min, 4°C离心15min, 弃上清; 用预冷的75%乙醇洗涤沉淀, 14000r/min, 4°C离心10min, 去除上清, 干燥沉淀。通常input DNA用20μL TE溶解; ChIP DNA用10μL TE溶解。-80°C冰箱保存或立即构建文库。
18. 取 input DNA (1μg)和 ChIP DNA, 按照 NEBNext DNA 超快速文库制备试剂盒(E7370S)的说明书指示制备测序文库。使用磁珠筛选片段大小在 250—300bp 之间的文库进行双端 PE50 测序。