

染色质免疫共沉淀超声波破碎条件的研究

张丽丽^{1,2}, 徐碧玉², 刘菊华², 贾彩红², 张建斌², 王甲水³, 金志强^{2,3}

(¹海南大学,海口 570228; ²中国热带农业科学院热带生物技术研究所,农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室,海口 571101; ³中国热带农业科学院海口实验站,海口 570102)

摘要:意在找出拟南芥幼苗适宜的染色质免疫共沉淀(ChIP)超声波破碎的条件,为后期抗体的沉淀提供适当大小的片段。以拟南芥(*Columbia ecotype*)幼苗为材料,用1%浓度甲醛的缓冲液交联DNA和蛋白质,利用超声波将其染色质随机断裂成适当大小的片段。结果表明,适用于拟南芥幼苗的最佳ChIP试验条件为:用1%甲醛溶液交联DNA和蛋白质的复合物;用65%功率,每次工作20 s,间隔4 min,8次破碎该复合物,可以得到400~800 bp大小的片段,用于后续的试验。经本实验的研究得到了拟南芥幼苗染色质免疫共沉淀超声波破碎的最佳条件,为后续实验奠定了基础。

关键词:拟南芥;染色质免疫共沉淀技术;超声波破碎条件;甲醛交联

中图分类号:Q-33

文献标志码:A

论文编号:2012-0979

Exploration of Sonication Conditions with Chromatin Immunoprecipitation

Zhang Lili^{1,2}, Xu Biyu², Liu Juhua², Jia Caihong², Zhang Jianbin², Wang Jiashui³, Jin Zhiqiang^{2,3}

(*Hainan University, Haikou 570228;*

²Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture; Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101;

³Haikou Experimental Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 570102)

Abstract: This study intended to identify suitable ultrasonic conditions of ChIP which would provide appropriate fragments for the precipitation of antibody in *Arabidopsis* seedlings (*Columbia ecotype*). *Arabidopsis thaliana* tissues were fixed with 1% concentrations formaldehyde for protein to DNA cross-linking, sonicated to shear the DNA into fragments of appropriate size. The results showed that the optimal sonication conditions for ChIP of *Arabidopsis thaliana* seedlings turned out to be 8 rounds of 20 seconds each time at 65% power, interval of 4 min each time which was sufficient to obtain 400–800 bp size DNA fragments for the subsequent experiment. Suitable ultrasonic conditions of ChIP were identified through the present study. It laid the foundation for the subsequent experiments.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; chromatin immunoprecipitation; sonication conditions; formaldehyde crosslinking

0 引言

蛋白质和DNA之间的相互作用对于许多细胞功能来说是必不可少的,转录被转录因子间的动态关联

或基因调控区域内的目标DNA序列的染色质修饰所控制。这些关联被DNA的修饰(CpG核苷酸的甲基化)^[1],组蛋白翻译后修饰^[2-4]和组蛋白变体的参与^[5]所

基金项目:“十二五”农村领域国家科技计划课题“香蕉分子育种与品种创新”(2011AA10020605);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金“香蕉转录因子对果实品质形成的调控作用研究”(ITBB110202)。

第一作者简介:张丽丽,女,1984年出生,山东滨州人,博士研究生,主要从事热带植物分子遗传学研究。通信地址:571101海口市龙华区学院路4号中国热带农业科学院热带生物技术研究所, Tel: 0898-66890772, E-mail: fybh_1984@163.com。

通讯作者:金志强,男,1962年出生,陕西咸阳人,研究员,博士生导师,博士,研究方向:主要从事热带园艺植物遗传改良研究。通信地址:571101海口市龙华区学院路4号中国热带农业科学院热带生物技术研究所, Tel: 0898-66890772, E-mail: zhiqiangjin2001@yahoo.com.cn。

收稿日期:2012-03-19, **修回日期:**2012-05-21。

调控。这些变化通常被称为表观遗传修改。这些修改构成一个遗传密码被效应蛋白所解读来开启、关闭或微调转录^[6]。

目前,研究DNA-蛋白质相互作用的技术方法有多种,但研究体内状态下的方法仅有染色质免疫共沉淀技术(Chromatin Immunoprecipitation, ChIP)^[7-8]。染色体免疫共沉淀是基于体内分析发展起来的方法,在体内分析蛋白质-DNA的相互作用,它可以定位蛋白的DNA作用位点,研究单个启动子的改变以及在整个基因组水平分析转录因子的分布图谱。近年来,此技术经过不断的发展和完善,特别是与DNA芯片和分子克隆技术相结合,可用于高通量的筛选已知蛋白因子的未知DNA靶点和研究反式作用因子在整个基因组上的分布情况。此技术应用于研究转录因子与DNA的结合^[9-12],是近几年才发展起来的。ChIP与其他方法的结合,扩大了其应用范围:ChIP与基因芯片相结合建立的CHIP-chip方法已广泛用于特定反式因子靶基因的高通量筛选^[13];ChIP-seq是将ChIP与测序技术相结合,在全基因组范围内检测DNA组蛋白修饰的高通量方法,可以应用到任何基因组序列的物种,并能确切得到每一个片段的序列信息^[14]。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^[15];RNA-ChIP用于研究RNA在基因表达调控中的作用^[16]。ChIP-chip技术已经被广泛应用于研究转录因子在整个基因组中的信号网络^[17],染色质修饰机制在基因组中的调控^[18],DNA的复制,修复以及修饰^[19],基因的转录与核运输^[20]等诸多方面。ChIP-seq越来越广泛的应用到DNA与互作蛋白分析。该技术的主要困难在于测序完成后对海量数据的分析^[21]。

染色质免疫沉淀技术的原理是:在生理状态下把细胞内的DNA与蛋白质交联在一起,通过超声或酶处理将染色质切为小片段(200~1000 bp, 400~800 bp最佳)后,然后通过目的蛋白特异性抗体沉淀此复合物,将与目的蛋白相结合的DNA片段沉淀下来。通过对目的片段的纯化和检测,从而获得蛋白质与DNA相互作用的信息。甲醛可以用来蛋白质与DNA、RNA、蛋白质之间的交联。经Ricardi等^[22]研究甲醛交联的最适浓度为1%,Ricardi所用的破碎番茄的超声波破碎程序是用15%功率,每次工作10 s,5次破碎染色质与DNA的复合物。目前,已报道的超声波破碎绝大部分都是针对培养的细胞,Sharma等^[23]对Hela细胞(2×10^7)的超声波破碎条件是共破碎6~8次,每次10 s,至DNA片段为1000~1500 bp。Bowler等^[24]对植物细胞的破碎条件是每次破碎10 s,共4次,功率5%,可以

得到500~2000 bp的片段。很少有直接对植物组织进行超声波破碎的,并且还没有对超声波破碎条件各个影响因素进行系统研究的报道。

总体来说,随着ChIP技术的广泛应用,如何优化ChIP技术来得到更多的与蛋白互作的DNA信息成为迫切需要解决的问题,目前对于染色质免疫共沉淀超声波破碎的条件摸索缺乏系统而全面的研究,尤其是对于整个植株超声波破碎条件的摸索更是欠缺。得到合适大小的片段是后续进行染色质免疫共沉淀的基础,它影响着抗体与片段结合的效率,直接关系到最后得到与特定蛋白质作用的DNA片段的信息量的大小,本实验意在探索得到拟南芥幼苗最佳染色质片段大小的超声波破碎条件,以便暴露目标蛋白,利于抗体识别,为后续的ChIP做好铺垫,更好的提高ChIP的效率。为拟南芥染色质免疫共沉淀技术的应用奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

野生型拟南芥(*Columbia ecotype*)在本实验室的培养房和人工气候箱中培养。以MS培养基为基质,温度控制在21~23℃,每日光照时间为8 h,暗培养时间为16 h,光照强度为2000 lx,培养室相对湿度为70%。在培养皿里生长15天后,选择长出2~4片真叶的籽苗。

Mira cloth购自美国CALBIOCHEM公司,蛋白酶抑制剂Complete protease inhibitor cocktail(Roche, cat. No. 04693116001)超声波破碎仪型号是Misonix Sonicator 4000。

1.2 方法

1.2.1 组织的收集和固定 取0.8 g新鲜组织到50 mL的离心管中,收集的时间在40~60 min,然后在50 mL的离心管中交联组织,加入MC buffer 25 mL(0.1 M蔗糖,10 mmol/L磷酸钠pH 7,50 mmol/L氯化钠),1%的甲醛溶液,在真空冰上进行,10 min后释放真空。混匀组织,然后重新放入真空中10 min(组织必须没入缓冲液中,不能漂在表面)。加入2.5 mL甘氨酸终止交联,来回颠倒混匀,真空放置2 min。用MC buffer洗涤3次(25 mL/次),然后在液氮中迅速冷却(组织在这一步可以保存在-80℃)。

1.2.2 核分离和染色质剪断 在液氮中彻底磨碎组织。转移粉末到50 mL的离心管中,加入20 mL M1 buffer(10 mmol/L磷酸钠pH 7,0.1 mol/L氯化钠,1 M 2-甲基-2,4-戊二醇,10 mmol/L β -巯基乙醇,每50 mL溶解一片蛋白酶抑制剂),之后用Mira cloth过滤悬浮液到50 mL的离心管中(整个过程都在冰上进行),加5 mL

M1 buffer 冲洗网孔, 便于收集完全。收集到将滤液 1000 g, 4℃ 离心 20 min。用 5 mL M2 buffer (10 mmol/L 磷酸钠 pH 7, 0.1 M 氯化钠, 1 M 2-甲基-2,4-戊二醇, 10 mmol/L β -巯基乙醇, 10 mmol/L 氯化镁, 0.5% Triton X-100, 每 50 mL 溶解一片蛋白酶抑制剂) 洗涤沉淀 5 次, 1000 g, 4℃ 离心 10 min。然后用 5 mL M3 buffer (10 mmol/L 磷酸钠 pH 7, 0.1 M 氯化钠, 10 mmol/L β -巯基乙醇, 每 50 mL 溶解一片蛋白酶抑制剂) 洗涤 1 次, 1000 g, 4℃ 离心 10 min。最后用 500 μ L Sonic buffer (10 mmol/L 磷酸钠 pH 7, 0.1 mol/L 氯化钠, 0.5% Sarkosyl, 10 mmol/L EDTA, 每 50 mL 溶解一片蛋白酶抑制剂) 重悬沉淀以备下一步的超声波破碎使用。

2 结果与分析

2.1 超声波破碎条件功率大小的摸索

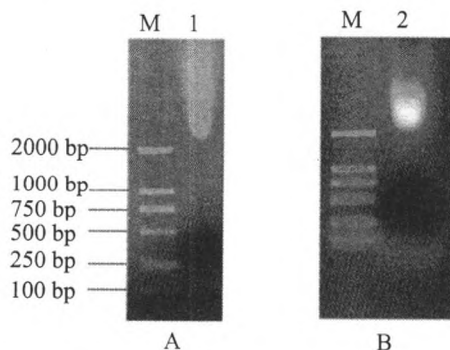
图 1A 表明功率为 40% 时, 得到的弥散条带集中在 2000 bp 以上; 而功率为 60% 时, 即加大了破碎功率后, 发现得到的弥散条带虽然仍然在 2000 bp 以上, 但是条带已经开始向 2000 bp 集 (图 1B)。

当功率加大到 80%, 在进行到第 5 个循环的时候被破碎的样品颜色开始变黑, 并且超声波破碎仪的声音很刺耳, 这时候不论是对样品还是超声波破碎仪的损害都很大。

如图 1 所示, 随着超声波破碎功率的增大, 破碎得到的片段会越小, 但增加到一定程度时 (80%), 要破碎的样品颜色会发黑, 并且功率越大, 破碎时产生的热量越多, 当产生的热量不能及时散去, 蛋白质就会变性, 严重影响后期 ChIP 的效率。随着每次破碎时间的延长, 破碎时产生的气泡就会增多, 所以每次破碎的时间不宜太久。

2.2 2 次超声波破碎之间间隔时间的摸索

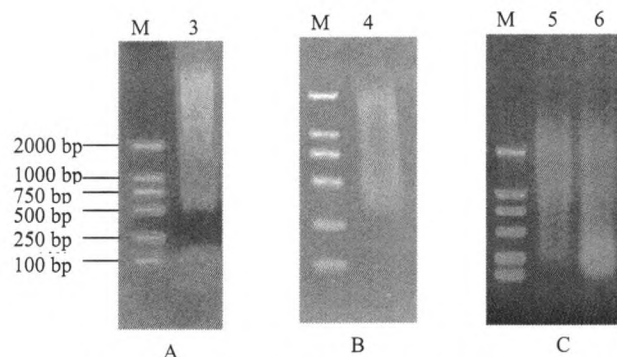
随着间隔时间的延长, 超声波破碎得到的弥散条带开始向 2000 bp 集中, 由图 2A 可以看出在间隔 2 min



M: DL2000 DNA marker; 破碎条件 A: 功率 40%, 10 s/次, 共 5 次, 每次间隔 1 min; 破碎条件 B: 60%, 10 s/次, 共 5 次, 每次间隔 1 min

图 1 超声波破碎功率大小的摸索

时, 弥散的条带除了一部分在 2000 bp 以上, 还有一部分条带集中在 500~2000 bp 之间。当时间间隔到 3 min 时 (图 2B), 大部分弥散条带都集中在 250~2000 bp 之间。但是当超声波破碎间隔的时间增加到 4 min 时 (图 2C, 5 号泳道), 条带的大小变化不是很明显, 而超声波破碎间隔的时间增加到 5 min 时 (图 2C, 6 号泳道), 弥散条带大部分开始集中在 100~2000 bp 之间, 并且在 100~250 bp 之间的片段较多。如图 2 所示, 随着间隔时间的加长, 破碎得到的片段越小, 并且变化很明显。推测这是因为随着间隔时间的加长, 每次超声波破碎时产生的气泡会消失的越多到最后基本没有气泡, 并且破碎时产生的热量能及时散去。当破碎的间隔时间到达 4 min 时, 已经覆盖了 ChIP 后续实验所需要的片段长度 (图 2)。



M: DL2000 DNA marker; 破碎条件 C: 功率 60%, 10 s/次, 共 8 次, 每次间隔 2 min; 破碎条件 D: 60%, 10 s/次, 共 8 次每次间隔 3 min; 破碎条件 E: 60%, 10 s/次, 共 8 次, 5 号泳道每次间隔 4 min, 6 号泳道每次间隔 5 min

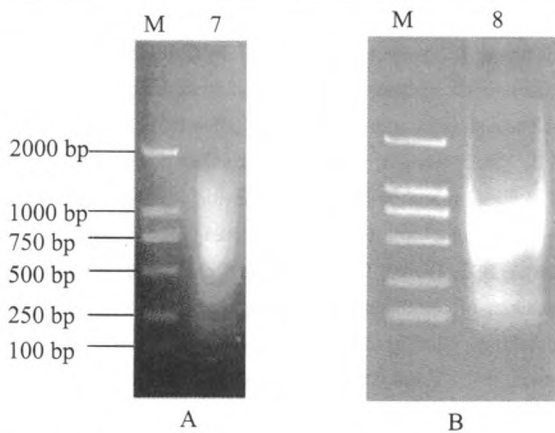
图 2 超声波破碎间隔时间的摸索

2.3 每次超声波破碎次数的摸索

为了缩小弥散条带的范围, 稍微加大了破碎的功率, 提高了每次破碎的时间, 结果发现当破碎条件为功率 65%, 15 s/次, 共 8 次, 每次间隔 4 min 时 (图 3A), 条带开始集中在 500~1500 bp 之间。然后为进一步缩小条带范围, 再次提高了每次破碎的时间, 超声波破碎条件为 65%, 20 s/次, 共 8 次, 每次间隔 4 min。结果发现条带大部分都集中在 400~800 bp 之间。达到了做染色质免疫共沉淀的最佳片段长度要求。

3 讨论

组织收集的时间要尽量缩短, 大概控制在 40~60 min 之间, 防止组织枯萎, 影响后续的实验。甲醛交联使 DNA 与蛋白质形成复合物的步骤是非常重要的。甲醛能有效的使蛋白质-蛋白质, 蛋白质-DNA, 蛋白质-RNA 交联, 形成生物复合体, 防止细胞内组分的



M: DL2000 DNA marker; 破碎条件F: 功率65%, 15 s/次, 共8次, 每次间隔4 min; 破碎条件G: 65%, 20 s/次, 共8次, 每次间隔4 min

图3 超声波破碎每次破碎时间的摸索

重新分布。甲醛的交联反应是完全可逆的, 这样才便于反交联之后对DNA和蛋白质进行分析。拟南芥交联所用的甲醛终浓度为1%, 甲醛的浓度太低则不能使蛋白质与DNA充分交联, 当甲醛浓度更高时反而不起作用, 这可能是由于高浓度的甲醛不能很好地解交联或者抑制了叶绿体的降解, 导致与叶绿体连在一起的细胞核中的染色质难以纯化^[23]。交联时间为20 min。交联时间如果过长, 细胞染色质难以用超声波破碎, 会影响ChIP结果, 而且实验材料也容易在离心的过程中丢失。交联时间如果过短, 则交联不完全, 产生假阴性。甲醛的交联反应随时可被加入的甘氨酸终止。

拟南芥染色质交联后经超声波破碎可被切成400~800 bp的片段(用琼脂糖凝胶电泳检测), 以便暴露目标蛋白, 利于抗体识别。超声波是使用机械力断裂染色质, 容易引起升温或产生泡沫, 这都会引起蛋白质变性, 进而影响ChIP的效率。所以在超声波断裂染色质时, 要在冰上进行, 且要设计时断时续的超声程序, 保证低温。另外, 超声探头要尽量深入管中, 但不接触管底或侧壁, 以免产生泡沫。总超声时间也不要太长, 以免蛋白降解。

超声波破碎主要是利用超声波空化产生的极大压力造成细胞壁破裂, 同时利用超声波震动作用加强胞内物质的溶解、释放。超声波功率较低时不能使细胞完全破碎, 得到的片段太大不利于后续抗体的结合。超声波破碎的功率太大, 产生的热量太多, 会导致蛋白质变性。超声波破碎的次数不宜太多, 反复破碎的次数太多会易引起蛋白质变性。每次超声波破碎的时间也要适宜, 每次超声波的时间太短, 则蛋白与DNA的复合物不能得到充分的破碎, 时间太长, 则产生的泡沫太多, 虽然破碎时样品放置在冰上, 但当破碎的时间太

长时, 产生的热量不能及时的散去, 就会引起蛋白质变性, 不能进行后期的研究。经本实验研究, 每2次超声波破碎的间隔时间的长短是影响得到的片段大小的重要因素, 在一定范围内, 随着破碎间隔时间的延长, 得到的片段大小有着最明显的变化。

综上所述, 超声波破碎功率的大小, 超声波破碎的次数, 每次超声波破碎的时间和2次超声波破碎之间间隔的时间都会影响破碎得到的片段大小, 进而影响后期抗体沉淀的效率。相对于以往对超声波破碎条件的简单描述, 本研究首次对拟南芥幼苗超声波破碎的条件进行了系统而全面的研究, 得到的超声波破碎条件适用于拟南芥幼苗, 在别的植物中是否适用目前还没研究。并且超声波破碎仪的类型不同, 破碎的条件会有相应的调整, 比如有的仪器不能设置中间超声波破碎的间隔时间, 这样每破碎一次就需要手动把样品放置在冰上一段时间, 然后再进行下一步的操作。但是可调整的变量和大概的调控范围是基本相同的。可以根据摸索的条件做一个相应的调整。另外超声波在破碎样品的时候声音非常刺耳, 超声波在介质中传播时, 介质质点震动的频率很高, 因而能量很大而且容易集中, 方向性又强, 所以对物质产生强大作用。这样强大的能量是人体不能承受的, 长期处于超声波环境之下, 就会对人体, 特别是精密器官产生损害, 所以在进行超声波破碎的时候, 要在消音箱内进行。相对于以往对细胞培养得到的细胞来进行破碎来讲, 形态结构复杂、具有器官分化的高等植物的破碎更为困难。Ricardi等^[22]对番茄的超声波破碎片段大小是200~1000 bp, 已经达到了抗体沉淀的有效范围。

4 结论

本实验以拟南芥幼苗为材料进行染色质免疫共沉淀超声波破碎条件的摸索, 结果表明, 适用于拟南芥幼苗的最佳ChIP试验条件为: 用1%甲醛溶液交联DNA和蛋白质的复合物; 用65%功率, 每次工作20 s, 间隔4 min, 8次破碎该复合物, 这时可以得到400~800 bp范围的DNA片段, 用于后续的试验。为得到更多的DNA与蛋白质相互作用的信息提供了条件, 也为染色质免疫共沉淀技术的应用奠定了基础。

参考文献

- [1] Antequera F. Structure, function and evolution of CpG island promoters [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2003, 60(8): 1647-1658.
- [2] Jenuwein T, Allis C D. Translating the histone code [J]. *Science*, 2001, 293(5532): 1074-1080.
- [3] Lachner M, Sengupta R, Schotta G, et al. Trilogies of histone lysine

- methylation as epigenetic landmarks of the eukaryotic genome [J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*,2004,(69):209-218.
- [4] Strahl B D, Allis C D. The language of covalent histone modifications [J]. *Nature*,2000,403(6765):41-45.
- [5] Mito Y, Henikoff J G, Henikoff S. Histone replacement marks the boundaries of cis-regulatory domains [J]. *Science*,2007,315(5817):1408-1411.
- [6] Ruthenburg A J, Allis C D, Wysocka J. Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark [J]. *Mol Cell*,2007,25(1):15-30.
- [7] Rusk N. Reverse ChIP [J]. *Nat Methods*,2009,6(3):187.
- [8] Déjardin J, Kingston R E. Purification of proteins associated with specific genomic loci [J]. *Cell*,2009,136(1):175-186.
- [9] Lee J, He K, Stolc V, et al. Analysis of transcription factor HYS genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development [J]. *Plant Cell*,2007,19(3),731-749.
- [10] Oh E, Kang H, Yamaguchi S, et al. Genome-wide analysis of genes targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE5 during seed germination in Arabidopsis [J]. *Plant Cell*,2009,21(2):403-419.
- [11] Ye Q, Zhu W, Li L, et al. Brassinosteroids control male fertility by regulating the expression of key genes involved in Arabidopsis anther and pollen development [J]. *PNAS*,2010,107(13):6100-6105.
- [12] Kaufmann K, Muño J M, Jauregui R, et al. Target Genes of the MADS Transcription Factor SEPALLATA3: Integration of Developmental and Hormonal Pathways in the Arabidopsis Flower [J]. *PLoS Biol*,2009,7(4):0854-0857.
- [13] Blais A, Dynlacht B D. Devising transcriptional regulatory networks operating during the cell cycle and differentiation using ChIP-on-chip [J]. *Chromosome Res*,2005,13(3):275-288.
- [14] 李敏俐, 王薇, 陆祖宏. ChIP 技术及其在基因组水平上分析 DNA 与蛋白质相互作用 [J]. *遗传*,2010,32(3):219-228.
- [15] Sandmann T, Jakobsen J S, Furlong E E. ChIP-on-chip protocol for genome-wide analysis of transcription factor binding in *Drosophila melanogaster* embryos [J]. *Nat Protoc*,2006,1(6):2839-2855.
- [16] Li T, Xie Z, Wang Y, et al. A new combination of RNA-mediated DNA ligation and on-chip elongation for detecting viral RNA [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*,2008,62(1):26-33.
- [17] Hanlon S E, Lieb J D. Progress and challenges in profiling the dynamics of chromatin and transcription factor binding with DNA microarrays [J]. *Curr Opin Genet Dev*.2004,14(6):697-705.
- [18] Carter N P, Vetric D. Applications of genomic microarrays to explore human chromosome structure and function [J]. *Hum Mol Genet*,2004,13(2):297-302.
- [19] Woodfine K, Carter N P, Dunham I, et al. Investigating chromosome organization with genomic microarrays [J]. *Chromosome Res*,2005,13(3):249-257.
- [20] Rodriguez-Navarro S, Fischer T, Luo M J, et al. Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery [J]. *Cell*,2004,116(1):75-86.
- [21] Nix D A, Courdy S J, Boucher K M. Empirical methods for controlling false positives and estimating confidence in ChIP-Seq peaks [J]. *BMC Bioinformatics*,2008(9):523.
- [22] Ricardi M M, Gonzalez R M, Iusem N D. Protocol: Fine-tuning of a Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) protocol in tomato [J]. *Plant Methods*,2010,6(1):11.
- [23] Sharma D, Fondell J D. Ordered recruitment of histone acetyltransferases and the TRAP Mediator complex to thyroid hormone-responsive promoters in vivo [J]. *PNAS*,2002,99(12):7934-7939.
- [24] Bowler C, Benvenuto G, Laflamme P, et al. Chromatin techniques for plant cells [J]. *The Plant Journal*,2004(9):776-789.