



## 染色质免疫共沉淀实验方法

王泓力<sup>1,2</sup>, 焦雨铃<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院遗传与发育生物学研究所, 植物基因组学国家重点实验室, 北京 100101; <sup>2</sup>中国科学院大学, 北京 100049

**摘要** 染色质免疫共沉淀(ChIP)技术是一种检测蛋白质与DNA结合的实验技术。该方法可以先进行样品交联, 然后将蛋白质与DNA复合物进行随机DNA切断, 再借助免疫学方法特异性富集与目的蛋白相结合的DNA片段, 从而检测转录因子等目的蛋白质与DNA的结合情况, 鉴定基因启动子或其它DNA结合位点。该方法同时也可应用于研究基因组特定位点的组蛋白修饰情况。该文介绍了依赖交联固定的常规免疫共沉淀(X-ChIP), 以及适用于 $10^3$ 细胞级别微量实验材料的基于微球菌核酸酶非交联免疫共沉淀(ULI-NChIP)具体操作过程和注意事项。

**关键词** 染色质免疫共沉淀, 基于微球菌核酸酶非交联免疫共沉淀

王泓力, 焦雨铃 (2020). 染色质免疫共沉淀实验方法. 植物学报 55, 475–480.

DNA与蛋白质的相互作用在基因转录、DNA复制、染色质重组、染色质分离、染色质稳定、细胞周期进程以及表观遗传等细胞功能的调控中发挥关键作用。真核生物的基因组DNA与组蛋白以及其它调节蛋白的结合决定了染色质的三维结构。了解DNA结合蛋白影响特定基因功能的机理, 以及确定蛋白质与特定DNA的结合情况, 是DNA与蛋白质互作研究中经常遇到且至关重要的需求(Das et al., 2004)。染色质免疫共沉淀技术(Chromatin Immunoprecipitation, ChIP)是在活细胞状态下将蛋白质-DNA复合物稳定, 并将DNA随机切断为一定长度范围内的片段, 再利用免疫学方法特异性富集目的蛋白, 从而获得与目的蛋白相结合的DNA (Jackson, 1978; Collas, 2010)。对于获得的DNA, 可以进一步与其它实验技术(如定量PCR (Singal et al., 2002)和DNA印迹杂交(Orlando et al., 1997))相结合进行深入分析, 以验证预计与目的蛋白在相同复合体内的DNA序列是否存在。免疫共沉淀技术与高通量测序技术结合, 可以对组蛋白修饰和转录因子在全基因组范围内的分布进行客观、无预期检测(Weinmann et al., 2001; Das et al., 2004)。目前, 染色质免疫共沉淀技术已广泛应用于检测各类转录因子以及组蛋白结合位点的

体内定位(Collas, 2010)。

染色质免疫共沉淀通常包括2种类型: 交联免疫共沉淀(cross-linked ChIP, X-ChIP)和无交联免疫共沉淀(native ChIP, N-ChIP)。X-ChIP一般采用甲醛作为可逆的交联剂, 通过超声波将染色质破碎为200–500 bp的片段; 免疫沉淀后, 将蛋白质-DNA复合体解交联, 蛋白质可通过蛋白酶进行降解, 然后纯化提取DNA (Orlando, 2000; Wells and Farnham, 2002)。由于甲醛固定增强了DNA与蛋白质的结合程度, 降低了蛋白质重排的可能性, 因此X-ChIP的灵敏度较高, 适用于转录因子等与DNA结合程度不是很强的蛋白质研究。N-ChIP是利用核酸酶消化未经固定的染色质, 由于未经固定的蛋白质-DNA复合体保持在自然状态, 因此N-ChIP适用于与DNA结合紧密的组蛋白修饰的表观遗传学研究; 同时, 由于抗体与未固定的目标蛋白质结合程度高, 因此N-ChIP的特异性较强, DNA富集效率高(O'Neill and Turner, 2003; Thorne et al., 2004)。

通常情况下, X-ChIP实验需要 $10^6$ – $10^7$ 个细胞(Mikkelsen et al., 2007; Barski et al., 2007), 至少需要 $10^3$ – $10^6$ 个细胞。此外, 交联在一定程度上会影响后续检测的质量(Adli et al., 2010; Hitchler and Rice,

收稿日期: 2020-05-08; 接受日期: 2020-08-13

基金项目: 国家自然科学基金(No.31861130355)

\* 通讯作者。E-mail: yljiao@genetics.ac.cn

2011)。基于微球菌核酸酶非交联免疫共沉淀(Ultra-Low-Input micrococcal nuclease-based Native ChIP, ULI-NChIP)适用于微量实验材料, 可以从 $10^3$ 个细胞起始构建高质量测序文库, 适用于组蛋白修饰情况研究(Brind'Amour et al., 2015)。目前, ULI-NChIP技术已应用于植物研究(Wang et al., 2017)。

本文以模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)为实验材料, 介绍了常规的交联染色质免疫共沉淀以及适用于微量样品的ULI-NChIP实验方法和注意事项。

## 1 实验材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)组织。

## 2 试剂及用具

- 蛋白酶抑制剂(Roche, Cat No.04693132001), 在使用前加入。
- 苯甲基磺酰氟(Phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF, Sigma-Aldrich, Cat No.P7626), 在使用前加入。
- Protein A Dynabeads (Life Technologies, Cat No.1006D)。
- Protein G Dynabeads (Life Technologies, Cat No.1007D)。
- RNase A (Roche, Cat No.11119915001)。
- 蛋白酶K (Life Technologies, Cat No.25530-049)。
- 核提取缓冲液(Sigma-Aldrich, Cat No.NUC-101)。
- 微球菌核酸酶(Micrococcal nuclease, MNase)、MNase缓冲液(NEB, Cat No.M2047)。
- 固相萃取柱(Qiagen, Cat No.129046)。
- 线性聚丙烯酰胺(Sigma-Aldrich, Cat No.56-575)。
- 神奇滤布(Millipore, Cat No.475855)。

## 3 试剂配方

- M1缓冲液: 10 mmol·L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液(pH7.2), 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 10 mmol·L<sup>-1</sup> β-巯基乙醇, 1 mol·L<sup>-1</sup>戊二醇, 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> PMSF, 1×蛋白酶抑制剂, 现配现用。

- M2缓冲液: 10 mmol·L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液(pH7.2), 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 10 mmol·L<sup>-1</sup> β-巯基乙醇, 1 mol·L<sup>-1</sup>戊二醇, 10 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0.5% Triton X-100, 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> PMSF, 1×蛋白酶抑制剂, 现配现用。
- M3缓冲液: 10 mmol·L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液(pH7.2), 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 10 mmol·L<sup>-1</sup> β-巯基乙醇, 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> PMSF, 1×蛋白酶抑制剂, 现配现用。
- 核裂解缓冲液: 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH8.0), 10 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 1% SDS, 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> PMSF, 2×蛋白酶抑制剂, 现配现用。
- ChIP稀释缓冲液: 1.1% Triton X-100, 1.2 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 16.7 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH8.0), 167 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> PMSF, 1×蛋白酶抑制剂。
- 低盐缓冲液: 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH8.0)。
- 高盐缓冲液: 500 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH8.0)。
- 氯化锂缓冲液: 0.25 mol·L<sup>-1</sup> LiCl, 1%脱氧胆酸钠, 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH8.0)。
- TE缓冲液: 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH8.0)。
- ChIP洗脱缓冲液: 100 mmol·L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, 1% SDS。
- 洗脱缓冲液: 10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH8.0)。
- 蛋白水解缓冲液(每个样品31.5 μL): 20 μL 1 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH6.8), 10 μL 0.5 mol·L<sup>-1</sup> EDTA, 1.5 μL 20 mg·mL<sup>-1</sup>蛋白酶K。
- Galbraith缓冲液: 45 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 30 mmol·L<sup>-1</sup>柠檬酸钠, 20 mmol·L<sup>-1</sup> MES (pH7.0), 现用现配。
- MNase稀释缓冲液: 10 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH7.5), 10 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 50%甘油。
- ChIP缓冲液: 20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH8.0), 2 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 0.1% Triton X-100, 1×蛋白酶抑制剂, 1 mmol·L<sup>-1</sup> PMSF。

## 4 仪器设备

- 旋转摇床: Labquake, Thermo Scientific。
- 离心机: 5418R或5810R, Eppendorf。
- 超声破碎仪: Bioruptor, Diagenode。
- 磁力架: DynaMag-2, Life Technologies。
- 4°C冷室。
- 凝胶电泳仪。

## 5 实验程序

### 5.1 实验流程

具体实验流程见图1。

### 5.2 交联染色质免疫共沉淀

#### 5.2.1 染色质制备

- (1) 取约1 g实验材料, 在液氮中将材料充分研磨, 加入预冷后装有35 mL M1缓冲液的50 mL离心管中涡旋振荡混匀。
- (2) 加入972  $\mu\text{L}$  37%甲醛(终浓度1%), 4°C缓慢旋转孵育10分钟。固定时间可以根据样品特性适当调整。
- (3) 加入2.4 mL  $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘氨酸溶液(终浓度为 $0.125 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )终止交联反应, 4°C缓慢旋转孵育10分钟。
- (4) 准备4层神奇滤布, 用双蒸水润洗后将溶液过滤至新的50 mL离心管中。4°C下 $1\ 000 \times g$ 离心20分钟, 弃上清。

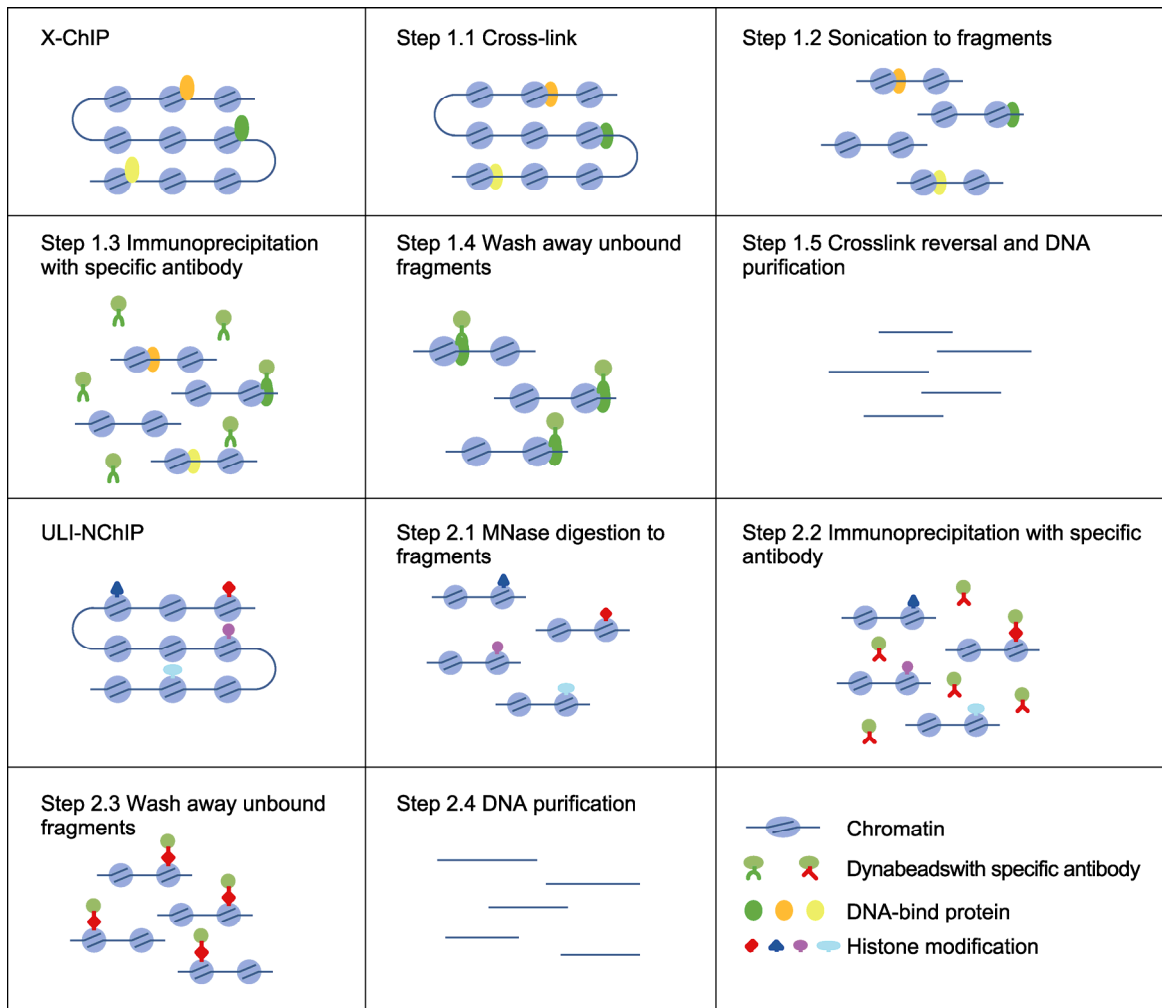


图1 交联免疫共沉淀(X-ChIP)与基于微球菌核酸酶非交联免疫共沉淀(ULI-NChIP)实验流程图

Figure 1 Schematic representation of cross-linked ChIP (X-ChIP) and ultra-low-input micrococcal nuclease-based native ChIP (ULI-NChIP) procedure

(5) 用20 mL M2缓冲液重悬沉淀, 注意用移液枪缓慢吹吸避免产生气泡。4°C下1 000 ×g离心20分钟, 弃上清。

(6) 重复以上步骤, 用M2缓冲液再洗1次。

(7) 用8 mL M3缓冲液重悬沉淀, 4°C下1 000 ×g离心10分钟, 用移液枪尽量去除上清。

(8) 加1 mL核裂解缓冲液重悬沉淀, 转移至2个1.5 mL离心管中。

(9) 用超声破碎仪打断DNA, 初次使用时, 需要摸索超声条件, 可以取1 μL 5.2.3节(5)中DNA纯化后的产物进行凝胶电泳, 要求弥散带在200 bp–1 kb之间, 集中富集在200–500 bp。参考超声破碎条件: 强度选择为高, 30秒/ON, 30秒/OFF, 6个循环, 重复2次。

(10) 4°C下16 000 ×g离心15分钟, 合并两管上清(约1 mL)至新1.5 mL离心管中。

(11) 取100 μL作为给料对照(input)置于–20°C冰箱暂存。

(12) 剩余样品用ChIP稀释缓冲液稀释3–5倍。

### 5.2.2 免疫沉淀

(1) 取100 μL Protein A/G Dynabeads, 加1 mL ChIP稀释缓冲液清洗3次后, 用100 μL ChIP稀释缓冲液重悬磁珠, 加入取出给料对照的样品(稀释后)中, 于4°C缓慢旋转, 预杂交染色质1小时。

(2) 将样品置于磁力架上, 转移上清至新的离心管中, 加入1 μg抗体, 于4°C缓慢旋转, 孵育过夜。

(3) 加入100 μL用同样方法清洗后的磁珠, 4°C缓慢旋转孵育1小时。

(4) 将样品置于磁力架上, 弃上清, 依次加入1 mL低盐缓冲液、高盐缓冲液、氯化锂缓冲液、TE缓冲液清洗磁珠, 每次清洗均于4°C缓慢旋转5分钟。

(5) 清洗结束后, 用移液枪尽量吸去上清, 加入250 μL ChIP洗脱缓冲液。

(6) 取出给料对照, 加入150 μL ChIP洗脱缓冲液, 总体积为250 μL, 与实验组样品同时进行后续步骤。

(7) 将样品和给料对照分别于65°C孵育15分钟, 然后将样品置于磁力架上, 转移上清至新的离心管中。

(8) 分别加入250 μL ChIP洗脱缓冲液, 重复洗脱1次, 将2次洗脱液合并, 体积约为500 μL。

(9) 在洗脱液中分别加入20 μL 5 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 65°C解交联至少6小时, 解交联后可置于–20°C冰箱暂存。

### 5.2.3 DNA纯化

(1) 取出样品放至室温。每管加入31.5 μL蛋白水解缓冲液, 45°C孵育1小时。加入20 μg RNase A, 37°C孵育30分钟。

(2) 加入等体积苯酚、氯仿、异戊醇混合物(25:24:1, v/v/v)抽提, 16 000 ×g离心5分钟。

(3) 取上清液, 按照1:100体积比加入20 mg·mL<sup>-1</sup> 糖原助沉剂, 混匀, 然后按照1:10体积比加入3 mol·L<sup>-1</sup> NaAc (pH5.2), 混匀, 最后加入1 mL无水乙醇, –20°C沉淀3小时。

(4) 4°C下16 000 ×g离心20分钟。用70%乙醇洗涤2次。

(5) 弃上清, 待乙醇完全挥发后, 加入100 μL双蒸水, 充分混匀, 即为目的DNA。

## 5.3 ULI-NChIP

### 5.3.1 染色质制备

(1) 取约10 mg实验材料于1.5 mL离心管中, 加入30 μL Galbraith缓冲液, 于冰上充分研磨, 再用20 μL Galbraith缓冲液冲洗研磨棒, 合并混合后约50 μL。4°C下1 000 ×g离心10分钟, 弃上清。

(2) 加入50 μL核提取缓冲液重悬沉淀。

(3) 取0.5 μL MNase, 加入4.5 μL MNase稀释缓冲液稀释至200 U·μL<sup>-1</sup>。需要注意的是, MNase对温度十分敏感, 建议将酶分装保存, 并且在初次使用时检测酶切割效率, 可以取1 μL 5.3.3节(5)中DNA纯化后的产物进行凝胶电泳检测, 弥散带应集中富集在200–500 bp。

(4) 加入6 μL MNase缓冲液, 0.88 μL 0.1 mol·L<sup>-1</sup> DTT, 2.5 μL双蒸水, 0.6 μL稀释后的200 U·μL<sup>-1</sup> MNase, 用枪头吹打至充分混匀。37°C孵育7.5分钟。

(5) 加入6.6 μL 100 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 用枪头吹打至充分混匀, 终止反应。

(6) 加入6.6 μL 1% Triton X-100/1%脱氧胆酸钠, 充分混匀, 冰上静置15分钟后涡旋振荡30秒。

(7) 加入227 μL ChIP缓冲液, 4°C缓慢旋转1小时。

(8) 涡旋振荡30秒后, 取30 μL作为给料对照, 加入3 μL 10% SDS, 充分混匀, 加入67 μL洗脱缓冲液, 置于–20°C冰箱暂存。

### 5.3.2 免疫沉淀

(1) 取10 μL Protein A/G Dynabeads, 加1 mL ChIP

缓冲液清洗3次后用10  $\mu\text{L}$  ChIP缓冲液重悬磁珠, 然后加入取出给料对照后的样品中, 于4 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢旋转, 预杂交染色质至少2小时。

(2) 取10  $\mu\text{L}$  Protein A/G Dynabeads, 同样清洗3次后, 加入200  $\mu\text{L}$  ChIP缓冲液重悬磁珠, 然后加入1  $\mu\text{g}$ 抗体, 于4 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢旋转, 孵育至少3小时。

(3) 将样品置于磁力架上, 弃掉步骤(2)的上清, 取步骤(1)的上清加入步骤(2)的磁珠中, 于4 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢旋转, 孵育过夜。

(4) 用磁力架吸附磁珠, 弃上清。加入200  $\mu\text{L}$ 低盐缓冲液, 用枪头吹打几次清洗磁珠, 重复清洗1次。再用200  $\mu\text{L}$ 高盐缓冲液清洗2次。

(5) 尽量吸去上清, 加入30  $\mu\text{L}$  ChIP洗脱缓冲液, 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1.5小时, 取上清。加入70  $\mu\text{L}$ 洗脱缓冲液清洗磁珠, 将2次上清液合并, 体积约为100  $\mu\text{L}$ 。

(6) 取出给料对照, 与实验组样品同时进行后续步骤。

### 5.3.3 DNA纯化

(1) 将洗脱下来的液体转移至固相萃取柱; 同时取出给料对照, 转移至另一个固相萃取柱。

(2) 在2个样品中分别加入100  $\mu\text{L}$ 苯酚、氯仿、异戊醇混合液(25:24:1, v/v/v), 剧烈涡旋振荡30秒, 16 000  $\times g$ 离心5分钟。

(3) 将上清液转移至新的1.5 mL离心管中, 加入10  $\mu\text{L}$  3 mol $\cdot\text{L}^{-1}$  NaAc, 1  $\mu\text{L}$ 线性聚丙烯酰胺, 充分混匀后, 加入275  $\mu\text{L}$ 预冷的无水乙醇, 充分混匀后于-20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀2-3小时。

(4) 4 $^{\circ}\text{C}$ 下16 000  $\times g$ 离心30分钟。弃上清, 加入200  $\mu\text{L}$ 现配的70%乙醇清洗沉淀。

(5) 弃上清, 待乙醇完全挥发后, 加入20  $\mu\text{L}$ 洗脱缓冲液, 充分混匀, 即为目的DNA。

### 5.4 纯化后分析

对于纯化后的DNA, 可以通过与其它实验结合进行深入分析。若研究特定目的基因的结合情况, 可以采用定量PCR, 以给料对照作为参照, 设置合适的PCR体系及程序, 分析DNA的富集程度; 若结合二代测序技术进行ChIP-seq, 可以参考DNA文库构建试剂盒(NEB, Cat No.E7645)进行建库、测序并分析DNA结合情况。

## 6 注意事项

(1) 交联。甲醛是最常用的交联剂(Orlando et al., 1997), 其优点在于形成的交联可逆, 但是需要注意交联时间, 过度的交联会导致超声波难以破碎, 也有可能造成蛋白质与DNA的间接结合。同时, 甲醛固定后消化酶不能再进行消化(Johnson and Bresnick, 2002)。

(2) 染色质切割。无论是X-ChIP还是N-ChIP, 染色质切割都是关键的一步。在使用超声破碎时, 需要摸索破碎条件, 使得染色质断裂的片段分布在200-500 bp之间。影响超声破碎的因素包括样品体积、超声探头深度、超声强度以及超声时间(Spencer et al., 2003)。超声时要保持在4 $^{\circ}\text{C}$ 。在利用核酸酶进行消化时, 必须严格控制不同样品的消化时间, 过度消化会导致亚核体的形成, 从而阻碍DNA-蛋白质相互作用的检测。

(3) 抗体。抗体是决定实验成败的重要因素, 因此必须选择IP级别的抗体, 同时要考虑单抗与多抗的选择。单抗的特异性强, 但是识别位点单一, 若靶蛋白被其它蛋白或核酸结合会导致该位点被封闭而不能识别。要根据抗体选择对应的Protein A或者G的磁珠。

(4) 操作。实验全程温度尽量保持在4 $^{\circ}\text{C}$ , 操作过程中避免起泡。

(5) 结果分析。染色质免疫共沉淀得到DNA片段未必说明抗体识别的目的蛋白能够直接结合DNA。与目的蛋白形成复合体的其它蛋白如果与DNA结合, 也可能富集DNA。

### 参考文献

- Adli M, Zhu J, Bernstein BE (2010). Genome-wide chromatin maps derived from limited numbers of hematopoietic progenitors. *Nat Methods* 7, 615-618.
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823-837.
- Brind'Amour J, Liu S, Hudson M, Chen C, Karimi MM, Lorincz MC (2015). An ultra-low-input native ChIP-seq protocol for genome-wide profiling of rare cell populations. *Nat Commun* 6, 6033.
- Collas P (2010). The current state of chromatin immunoprecipitation. *Mol Biotechnol* 45, 87-100.

- Das PM, Ramachandran K, van Wert J, Singal R** (2004). Chromatin immunoprecipitation assay. *Biotechniques* **37**, 961–969.
- Hitchler MJ, Rice JC** (2011). Genome-wide epigenetic analysis of human pluripotent stem cells by ChIP and ChIP-Seq. In: Schwartz PH, Wesselschmidt RL, eds. *Human Pluripotent Stem Cells: Methods and Protocols*. New York: Humana Press. pp. 253–267.
- Jackson V** (1978). Studies on histone organization in the nucleosome using formaldehyde as a reversible cross-linking agent. *Cell* **15**, 945–954.
- Johnson KD, Bresnick EH** (2002). Dissecting long-range transcriptional mechanisms by chromatin immunoprecipitation. *Methods* **26**, 27–36.
- Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig W, Jaenisch R, Nusbaum C, Lander ES, Bernstein BE** (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* **448**, 553–560.
- O'Neill LP, Turner BM** (2003). Immunoprecipitation of native chromatin: NChIP. *Methods* **31**, 76–82.
- Orlando V** (2000). Mapping chromosomal proteins *in vivo* by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci* **25**, 99–104.
- Orlando V, Strutt H, Paro R** (1997). Analysis of chromatin structure by *in vivo* formaldehyde cross-linking. *Methods* **11**, 205–214.
- Singal R, van Wert JM, Ferdinand L Jr** (2002). Methylation of alpha-type embryonic globin gene alpha pi represses transcription in primary erythroid cells. *Blood* **100**, 4217–4222.
- Spencer VA, Sun JM, Li L, Davie JR** (2003). Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods* **31**, 67–75.
- Thorne AW, Myers FA, Hebbes TR** (2004). Native chromatin immunoprecipitation. In: Tollefsbol TO, ed. *Epigenetics Protocols*. New York: Humana Press. pp. 21–44.
- Wang J, Tian C, Zhang C, Shi B, Cao X, Zhang TQ, Zhao Z, Wang JW, Jiao Y** (2017). Cytokinin signaling activates *WUSCHEL* expression during axillary meristem initiation. *Plant Cell* **29**, 1373–1387.
- Weinmann AS, Bartley SM, Zhang T, Zhang MQ, Farnham PJ** (2001). Use of chromatin immunoprecipitation to clone novel E2F target promoters. *Mol Cell Biol* **21**, 6820–6832.
- Wells J, Farnham PJ** (2002). Characterizing transcription factor binding sites using formaldehyde crosslinking and immunoprecipitation. *Methods* **26**, 48–56.

## Protocols for Chromatin Immunoprecipitation

Hongli Wang<sup>1,2</sup>, Yuling Jiao<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; <sup>2</sup>University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China

**Abstract** Chromatin immunoprecipitation (ChIP) is a technique used to investigate protein-DNA interaction. Briefly, protein and associated DNA are crosslinked, which is optional. Then the DNA-protein complexes are fragmented. By using an appropriate antibody, cross-linked DNA fragments associated with the protein of interest are selectively immunoprecipitated. ChIP is commonly used to identify binding regions of DNA-binding proteins, such as transcription factors. ChIP is also used to analyze histone modification profiles in combination with antibodies against specific histone modifications. Here we describe protocols and related tips for cross-linked ChIP and ultra-low-input micrococcal nuclease-based native ChIP (ULI-NChIP), which can be applied to rare cell populations at the 10<sup>3</sup> cell level.

**Key words** ChIP, ULI-NChIP

**Wang HL, Jiao YL** (2020). Protocols for chromatin immunoprecipitation. *Chin Bull Bot* **55**, 475–480.

\* Author for correspondence. E-mail: yljiao@genetics.ac.cn

(责任编辑: 朱亚娜)