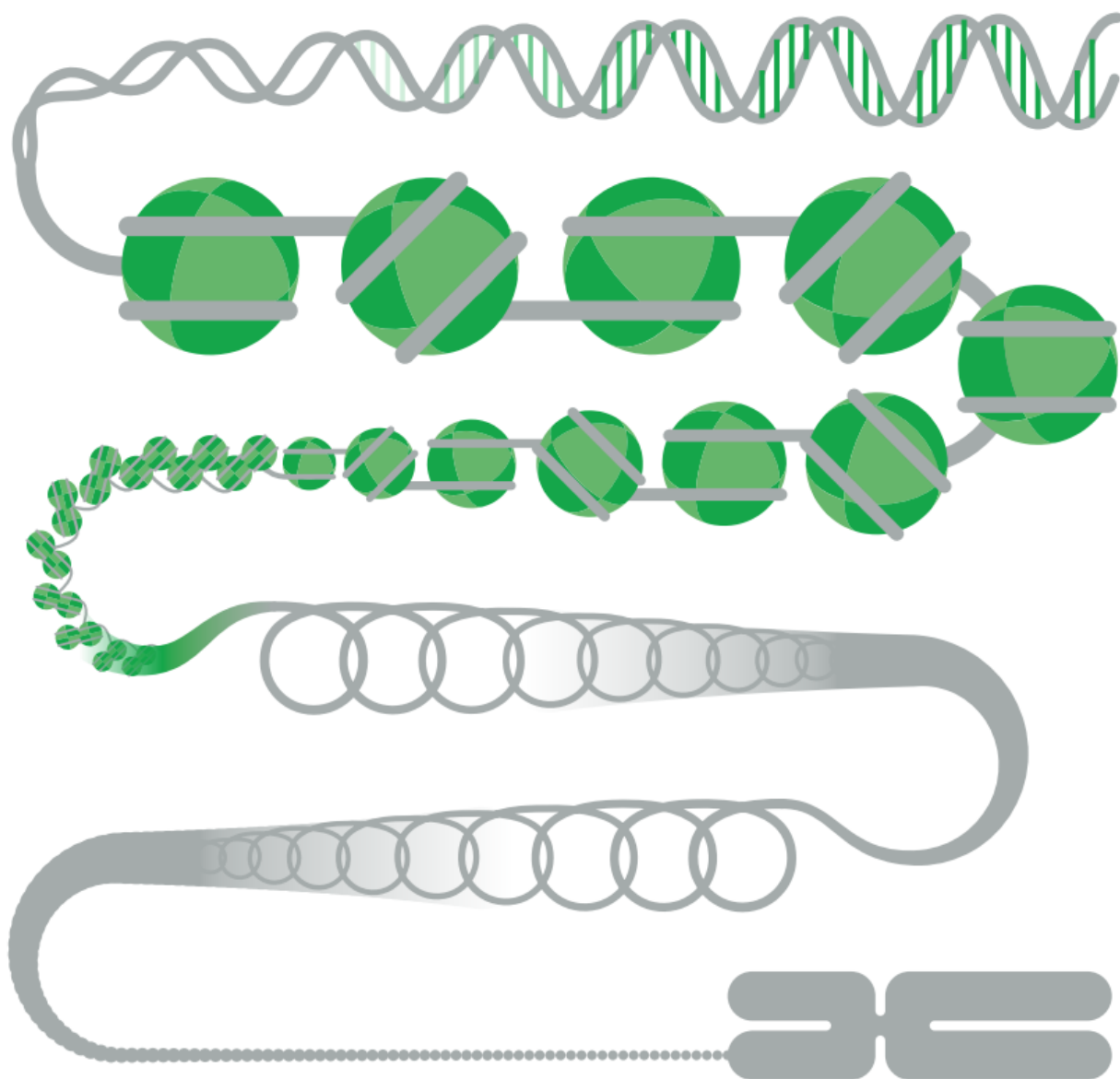


abcam

表观遗传学

应用指南



目录

引言	5
- 表观遗传学为何如此重要?	5
- 如何研究表观遗传学	5
染色质可及性和结构	7
- DNA 可及性与核小体定位的研究方法	8
- DNase-seq	8
- MNase-seq	8
- ATAC-seq	9
- 染色体构象技术	10
- 染色体构象捕获 (3C)	11
- 环状染色体构象捕获 (4C)	12
- 碳拷贝染色体构象捕获 (5C)	12
- 利用配对末端标签测序的染色质相互作用分析 (ChIA-PET)	12
- ChIP-loop	13
- Hi-C	13
- Capture-C	13
- 参考文献	14
组蛋白修饰	15
- 组蛋白修饰详情	16
- 乙酰化	16
- 甲基化	16
- 磷酸化	17
- 泛素化	18
- 通过 ChIP 研究组蛋白修饰	18
- 组蛋白修饰酶: writers 和 erasers	20
- 表征组蛋白甲基化通路	20
- 表征去甲基酶活性	21
- 表征组蛋白乙酰化通路	21
- 表征组蛋白去乙酰化酶活性	21
- 抑制 writers 和 erasers	22
- 组蛋白修饰 readers/translators	22
- 效应结构域识别特异性组蛋白修饰	22
- 多价性使组蛋白密码复杂化	23
- 参考文献	24
通过 ChIP 研究表观遗传学	25
- ChIP 的应用	25
- 组合分析	25
- ChIP 拓展了表观遗传学研究的范围和精度	26
- 实验方案概述: ChIP 是如何工作的?	26

- 样本制备: X-ChIP 与 N-ChIP	28
- 染色质片段化差异.....	29
- 抗体选择.....	30
- 对照.....	30
- 样本对照.....	30
- 抗体对照.....	30
- 定量 PCR 对照.....	31
- 方案优化.....	31
- 低细胞数的 ChIP.....	32
- 组织 ChIP.....	34
- 疑难解析.....	34
- ChIP 结果分析.....	36
- qPCR.....	36
- ChIP-on-Chip.....	36
- ChIP-seq.....	36
- 数据分析.....	37
- 参考文献.....	39
DNA 甲基化和去甲基化.....	40
- 亚硫酸氢盐测序.....	41
- 基于亚硫酸氢盐的应用.....	42
- 亚硫酸氢盐转化: 技术考量.....	43
- DNA 免疫沉淀 (DIP).....	44
- 基于 DIP 的应用.....	45
- DIP: 技术考量.....	45
- 捕获 5hmC、5fC 和 5caC 的替代方法.....	45
- 5hmC 定位.....	46
- 5fC/5caC 定位.....	47
- DNA 修饰测序方法的比较.....	47
- 液相色谱串联质谱法 (LC/MS-MS).....	49
- LC/MS-MS: 技术考量.....	49
- DNA 修饰 IHC/ICC.....	49
- DNA 修饰 IHC/ICC: 技术考量.....	50
- 甲基结合域蛋白 (MBDs).....	50
- MBDs: 技术考量.....	51
- 新型 DNA 修饰.....	51
- 新型 DNA 修饰: 技术考量.....	51
- DNA 甲基化和去甲基化参考文献.....	52
RNA 修饰.....	54
- RNA 免疫沉淀 (RIP).....	55
- RIP: 技术考量.....	56
- CLIP.....	57
- CLIP: 技术考量.....	58
- miCLIP.....	58

- miCLIP: 技术考量.....	60
- 液相色谱串联质谱法 (LC/MS-MS).....	60
- LC/MS-MS: 技术考量.....	60
- RNA 修饰对照实验.....	60
- RNase 处理.....	61
- DNase 处理.....	61
- 竞争法检测.....	61
- 斑点印迹法 (Dot blot).....	62
- RIP-MS	62
- 参考文献.....	63

引言

表观遗传学为何如此重要？

人类基因组计划的完成和新一代测序技术的进步揭示了基因组 DNA 对生物过程和疾病状态的控制比最初想象的要少得多。表观遗传因素反而决定了 DNA 如何翻译，DNA 结构的严格调控，及进而控制哪些基因在什么时间表达。

多种表观遗传因素共同协调从发育过程到细胞死亡通路的基本细胞程序。这些因素中的任何一项出现功能障碍都会扰乱基因组的调控，导致细胞过程出错，引发癌症及自身免疫紊乱、神经系统疾病、不孕不育等疾病。

为了解生物学或疾病的所有方面，有必要对可能起作用的表观遗传因素进行研究。本指南包含了表观遗传调控概述以及如何研究这些关键参与因素。

如何研究表观遗传学

表观遗传调控发生在许多相互作用的水平上，有必要平行观察所有这些水平，从而了解表观遗传学对生物学过程的促进作用。采用冗余方法从多个角度处理表观遗传学研究是确保结果准确的关键。

这里，我们重点讲述表观遗传调控的五个基本方面。

1. 染色质结构和可及性：

基因组 DNA 被包装并组织成染色质，以适合每个细胞的细胞核。基因组的一些区域包装紧密，无法进行转录，导致基因沉默。其他区域处于开放构象，允许转录因子和机制结合，从而进行活性基因转录。了解在不同的细胞或疾病状态下，哪些基因组区域在整个基因组中是活跃的以及哪些是不活跃的，有助于确定关键通路和相关基因。

2. 组蛋白修饰

组蛋白是负责包装 DNA 的蛋白质。修饰组蛋白的机制有很多种，包括乙酰化、甲基化和磷酸化，其目的在于控制组蛋白与 DNA 的相互作用，进而控制 DNA 的结构和基因激活。检查组蛋白修饰以及控制这些修饰的酶的活性，可以揭示特定基因位点或整个基因组的表观遗传调控和失调机制。

3. DNA 结合蛋白：

许多不同类型的蛋白质与 DNA 结合，直接或间接调控染色质构象和基因转录。识别特定区域或整个基因组中是否存在这类蛋白，有助于构建表观遗传调控和失调的全貌，并指出所涉及的特定参与因素和通路。我们可以通过染色质免疫沉淀 (ChIP) 来研究表观遗传调控的这些方面。

4. DNA 修饰:

在整个 DNA 序列中,存在许多化学修饰。这些化学修饰中,研究得最透彻的是 5-甲基胞嘧啶 (5mC),这种修饰被普遍视为基因表达的一种稳定的、抑制性的调节因子。大量研究显示,DNA 中的 5mC 和其他化学修饰在基因调控中具有表观遗传作用。确定这些标记及其在生物学中的功能目前是表观遗传学极具吸引力的一个领域。

5. RNA 修饰

科学家们仍在不断发现新的 RNA 修饰和现有修饰的新功能。许多被认为只存在于细菌中的 RNA 修饰在真核细胞中被发现,而其他推测仅存在于某些 RNA 上的 RNA 修饰(如 tRNA)现在被发现在哺乳动物的 mRNA 翻译中起到关键作用。RNA 修饰这一课题目前非常火热,对该领域的研究仍有很多内容需要探索。

染色质可及性和结构

基因组被有效地包装到细胞核中。DNA 缠绕在组蛋白周围，形成核小体，核小体由 147 个碱基对的 DNA 和 8 个核心组蛋白组成。核小体像珠串一样串连在一起，并被包装成更高阶的染色质结构(图 1)。

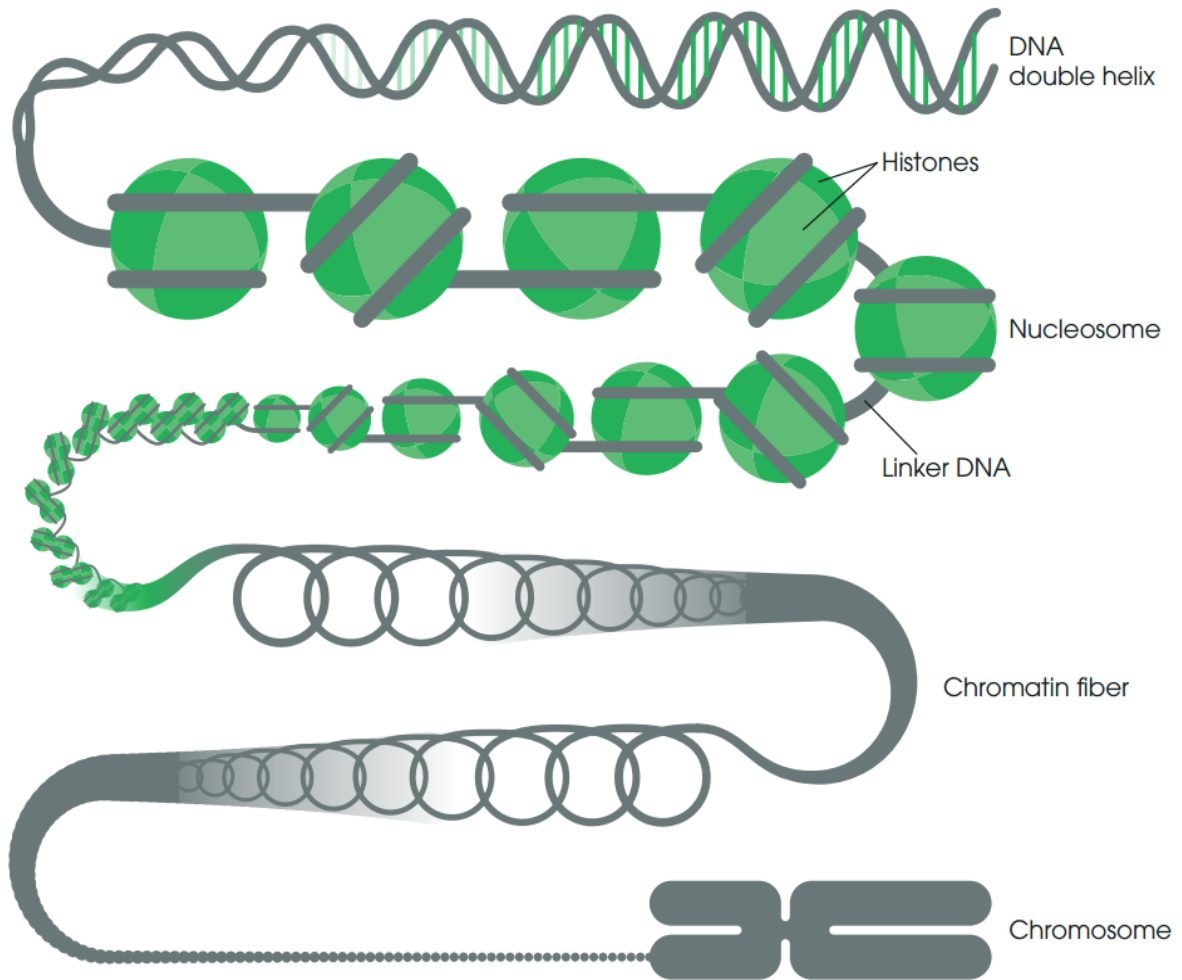


图 1：染色质结构。DNA 缠绕在核小体周围，形成染色质纤维，然后再形成染色体

紧密缠绕在核小体或更高阶异染色质中的 DNA 是无法与转录因子、转录机制和其他 DNA 结合蛋白相结合的，从而导致基因沉默。但同时，“接头” DNA 和打开的常染色质结构却易于结合，允许活跃的基因转录。

为了改变基因表达和细胞编程，染色质处于不断被重塑的动态中，例如在不同的发育阶段或响应特定的刺激时。大的基因组区域可能被沉默，可能被激活，或者核小体被打开，以便特定的基因和 DNA 序列与之结合。

对于染色质结构和核小体定位的探索揭示了与特定细胞进程和疾病状态相关的表观遗传程序和机制。

DNA 可及性与核小体定位的研究方法

为了了解在不同的细胞生物进程中染色质的结构与其功能之间的关系，首要步骤是对于暴露在外的活跃转录区域和异染色质中紧密结合区域的基因组的比较研究。想要诠释某一时刻的基因组架构，研究人员可以使用以下三种方法之一：DNase-seq、MNase-seq 或 ATAC-seq。

DNase-seq 和 ATAC-seq 绘制 DNA 的暴露区域，MNase-seq 则绘制受核小体保护的区域。有一点很重要请记住，这些方法展示的是一个动态过程中的某一瞬间，通常是反应了数千个细胞的平均状态。如果一个特定的区域呈现动态变化趋势，或者群体内细胞之间出现差异，那么不同方法得出的数据结构便会不一致。为了解决这些问题，一些单细胞分析方法正在开发中。

DNase-seq

DNase-seq 利用 DNase 来消化基因组的暴露区域，而与核小体结合的 DNA 不会被 DNase 消化。然后对 DNase 消化产生的小片段进行测序并将其定位到基因组，以确定活跃转录的区域。

优势

- 最成熟和实用的实验方法
- 对 DNase 剪切的偏差有明确解释
- 可用于反向推导未被剪切的基因组区域，称为 DNase 足迹法，旨在鉴定转录因子和核小体的结合位点。但是此类实验中，使用裸 DNA 作为对照很重要，因为 DNase I 的剪切偏差也可能导致错误的结论
- 可能会适用于单细胞分析

缺点

- 实际应用中有难度，尤其是在针对给定细胞类型/数量设计消化条件的时候
- 需要几百万个细胞，可能不利于病人样本稀少的情况

MNase-seq

与 DNase-seq 不同，MNase-seq 利用金黄色葡萄球菌的微球菌核酸酶 (MNase) 来消化掉暴露的基因组区域。然后对与核小体结合的 DNA 进行恢复并测序。

优势

- 从酵母到人类，是在众多种属的许多细胞类型中通用和成熟的实验方法并且消化和数据分析实现了一定的标准化
- 可与染色质免疫沉淀测序 (ChIP-seq) 结合使用，用于研究与核小体结合的调控因子
- 可用于生成碱基对分辨率图谱
- 可用于检测核小体定位以及核小体占有率和甲基组测序 (NOMe-seq) 中的 DNA 甲基化状态

缺点

- 需要大量细胞 (1-2 千万)
- AT 富集区消化过程中存在序列特异性偏差 (尽管在染色质可及性检测中使用的大多数酶都表现出了相似的偏差)，但也存在未知偏差可能导致错误的实验结果
- 尚不支持单细胞分析

ATAC-seq

转座酶可及性染色质分析测序 (ATAC)-seq 建立于 2013 年, 使用 Tn5 转座酶将测序接头直接插入 DNA 的暴露区域。然后用 qPCR 扩增接头之间的 DNA 并测序。

ATAC-seq 使用了一个预先装载 DNA 接头的突变超活性 Tn5 转座酶, 旨在对基因组进行酶切时, 同步标记被剪切的 DNA 片段 (这个过程称为标签化)。带标签的 DNA 片段通过 PCR 扩增并做二代测序 NGS。一个区域中序列的频率与打开的染色质构象相关。

优势

- 最简便的实验方法: 无需超声、酚-氯仿抽提、抗体 (ChIP-seq) 或酶消化 (DNase-seq、MNase-seq)
- 最快速的实验方法: 不到 3 小时即可完成, 其他方案可长达 4 天
- 信噪比最佳
- 仅需 50000 个或更少的细胞 (推荐使用 500-50000 个细胞)
- 单核苷酸分辨率有望实现
- 通过采用流式细胞术/微流体技术的改编方案, 可进行单细胞分析

缺点

- 费用较高, 需要使用 Illumina 公司的试剂盒 (Nextera DNA Library Preparation Kit)。
- 成熟度较低, 需要针对特定的细胞类型、组织和生物体优化细胞数量和裂解条件, 才能获得理想的片段分布。
- 细胞数量决定数据质量, 细胞过少或过多会导致过度转位或转位不足, 从而导致错误的结果。

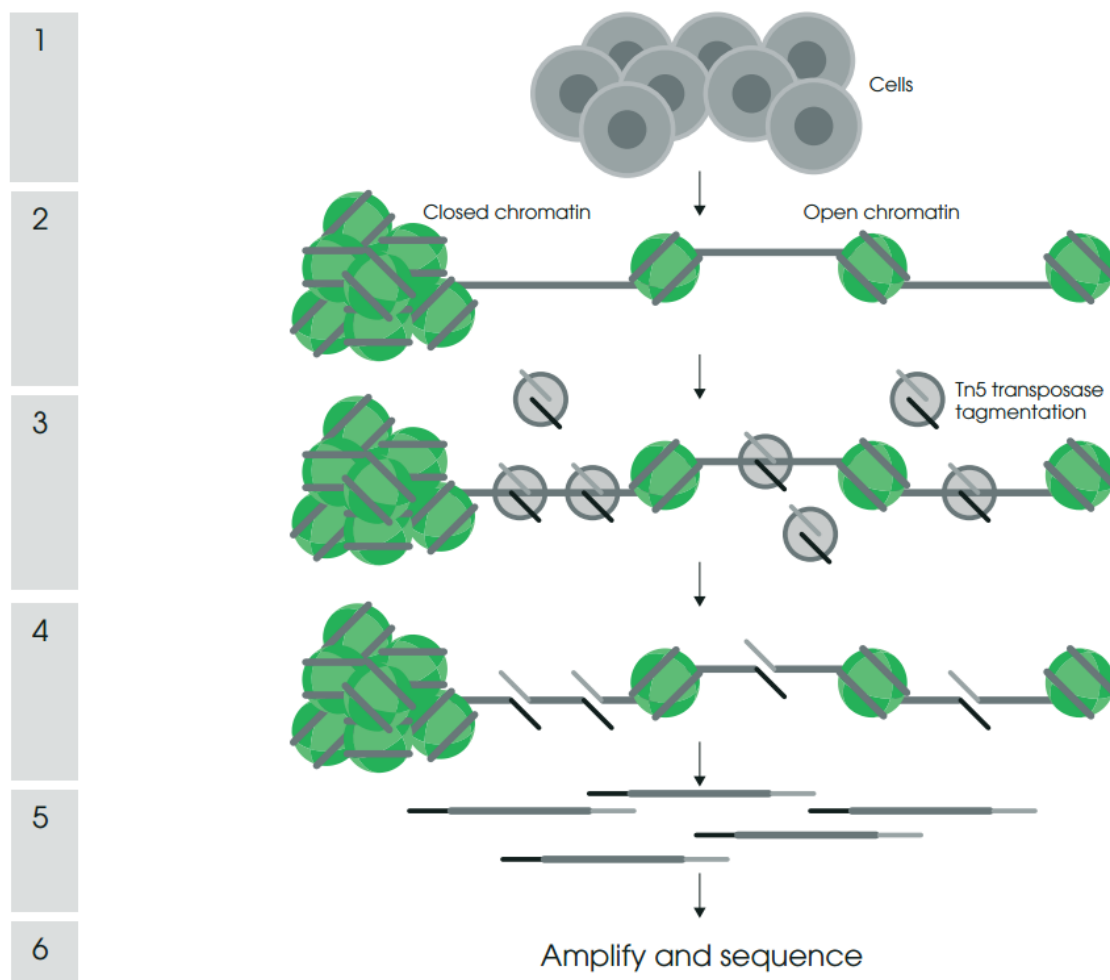


图 2: ATAC-seq 实验方案。可登录 www.abcam.com/atac 查看 ATAC seq 分步指南。

1. 收获 50,000 个细胞。准确的细胞数量是实验成功的关键。
2. 裂解细胞，产生粗制核裂解液。
3. Tn5 标记将基因组片段化，同时通过测序接头标记得到的 DNA。
4. 纯化经过片段化和标记的 DNA。
5. PCR 扩增并纯化扩增的 DNA。
6. 对文库进行测序，并将读数与开放和闭合染色质进行关联。

染色体构象技术

我们可以通过染色质接触图谱（chromatin contact mapping）来评估染色质三维结构，从而揭示远距离基因组区域之间的物理相互作用。染色质构象捕获（3C）技术的出现与以此为基础发展的技术方法使得这种类型的作图成为可能。每种方法对于特定应用都具有特殊的优势，基于方法学的多样性，根据特定的目的选择某一种方法具有一定的挑战性。

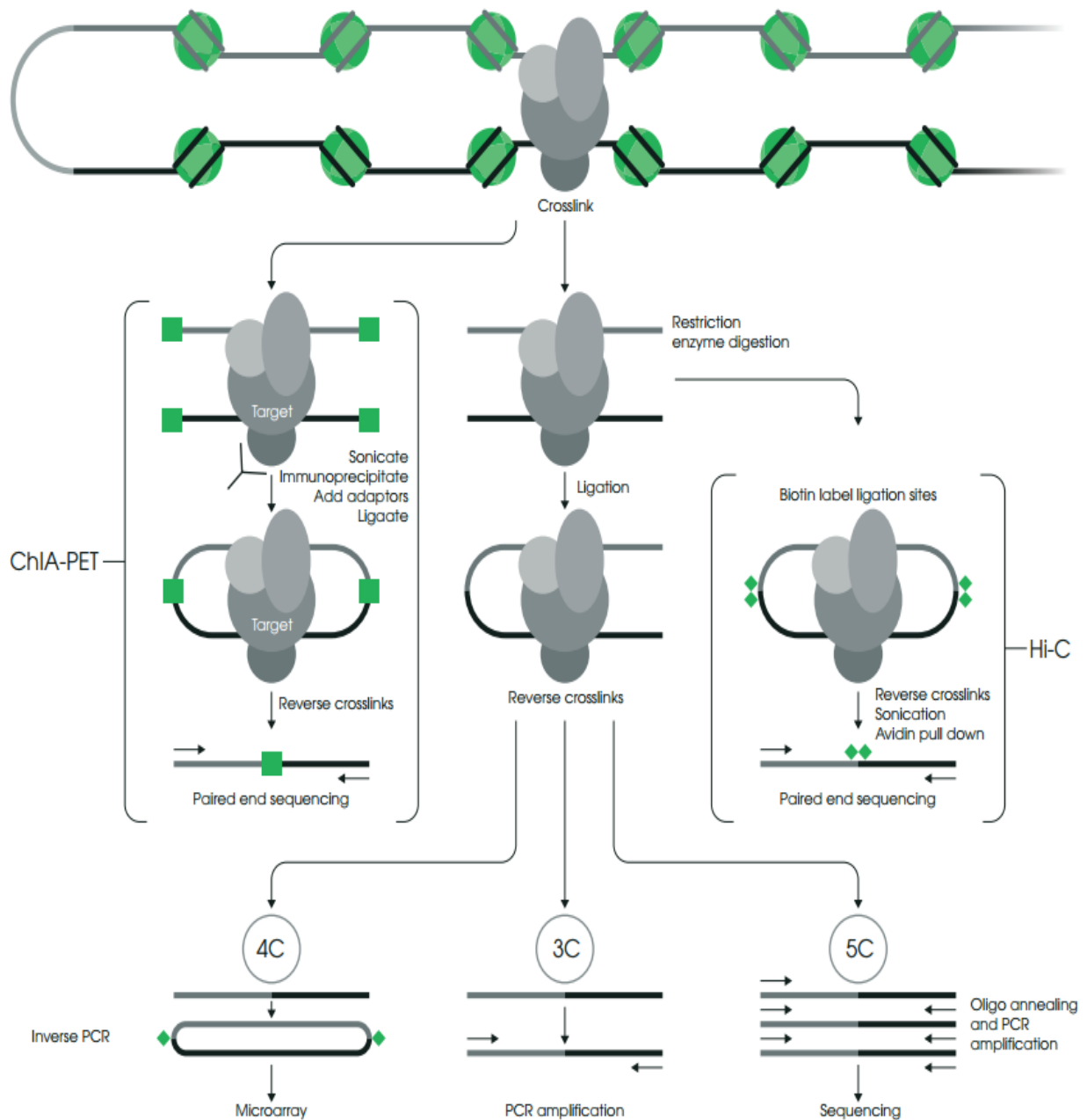


图 3: 染色体构象技术 3C、4C、5C、ChIA-PET 和 Hi-C 的不同步骤

染色体构象捕获 (3C)

3C 利用甲醛交联将 3 维染色质结构固定，然后进行限制性酶切。通过 qPCR 和测序分析切下的 DNA 片段，确定不同 DNA 区域的连接位置。这种用于分析 3D 染色质结构和相互作用的方法首次出现于 2002 年 (Dekker *et al.*, 2002)，现已成为更大规模、更高通量或特异性分析的一系列相关技术的基础。

环状染色体构象捕获 (4C)

4C 能够识别与目标位点相互作用的未知 DNA 区域,因此是发现特定区域内新的相互作用的理想之选 (Dekker *et al.*, 2006)。

提示:

- **选择合适的限制性内切酶。**内切酶越频密 (例如 4 个 bp 识别位点), 对研究目标区域和同一染色体上邻近序列之间的局部相互作用越好 (van der Werken *et al.*, 2012)。
- **优化交联步骤。**较低的甲醛浓度会促进目标区域的自连接, 但同时也会阻碍限制性内切酶切割形成的 DNA “hairballs”。较高的甲醛浓度能够降低自连接事件, 但会增加 “hairballs”。在特定的实验情况下, 应优化选择最佳的甲醛浓度来平衡这些考量。对于大多数实验, 可以从 1% 甲醛处理 10 分钟开始优化 (van der Werken *et al.*, 2012)。

碳拷贝染色体构象捕获 (5C)

5C 会形成与目标位点相结合的 DNA 区域的连接产物文库, 然后进行 NGS 分析。当需要了解目标区域的所有相互作用, 例如需要绘制特定染色体的详细相互作用矩阵, 那么 5C 是理想之选。但是, 5C 不是真正的全基因组, 因为每个 5C 引物必须单独设计, 所以 5C 最适合某一特定区域 (Dotsie and Dekker, 2007)。

提示:

- **选择合适的限制性内切酶。**在您的实验条件下选择一种高效的酶很有必要。例如, 大多数情况不推荐 BamHI, 因为它在 3C 条件下效率低 (Dotsie *et al.*, 2007)。
- **优化引物设计。**5C 使用了两种引物: 结合在连接位点上游的正向引物和紧邻下游的反向引物。应调整引物长度, 以便退火温度在 65°C 左右, 从而确保引物与其限制性片段完全退火。确保 5C 引物在合成时 5' 端有磷酸化位点, 用于连接。
- **使用对照模板。**这样可以控制引物效率方面的差异。推荐构建研究中整个基因组区域的对照文库。如果不构建对照文库, 相互作用强度的精确性会降低。

利用配对末端标签测序的染色质相互作用分析 (ChIA-PET)

ChIA-PET 结合染色质免疫沉淀 (ChIP) 和 3C 的特征, 通过特定蛋白来分析远端 DNA 区域的相互作用。

ChIA-PET 最适用于发现目标蛋白与未知 DNA 的相互作用, 例如研究转录因子的结合位点。因为在体内 DNA 就与转录因子结合, 产生了相互作用 (Fullwood *et al.*, 2009)。

提示:

- **重叠 PET 标签以减少背景。**与大多数 3C 技术一样, 背景噪音是个挑战。特别是在 ChIA-PET 中, 背景噪音增加了发现与目标位点远距离相互作用的难度。有一个实用的小技巧, 就是要求 PET 在区域的两端重叠, 可以远距离相互作用。

ChIP-loop

ChIP-loop 是染色质免疫沉淀 (ChIP) 和 3C 的结合, 其采用的抗体靶向至疑似结合目标 DNA 区域的蛋白。当确认两个已知的 DNA 区域是否与目的蛋白有相互作用, ChIP-loop 是理想之选。它适用于确认疑似的相互作用, 但不适用于发现新的相互作用 (Horike *et al.*, 2005)。

提示:

- **避免非天然环。**ChIP-loop 的最大问题在于连接发生前的 DNA 浓缩过程中会形成非天然环。有一个简单的方法可以避免这种情况, 那就是选择一个在连接步骤完成后再进行沉淀的方案 (Simons *et al.*, 2007)。
- **验证 ChIP-loop 的相互作用。**另一个挑战是连接产物的准确定量。3C 技术, 特别是 ChIP-loop, 通常会捕捉随机的相互作用。为了解决这个问题, 可以考虑同时进行一个 ChIP 实验来验证 ChIP-loop 的相互作用。如果 ChIP-loop 得到的 DNA-蛋白-DNA 相互作用的确属实, 那么两种 DNA-蛋白的相互作用也会在 ChIP 数据中体现 (Simons *et al.*, 2007)。

Hi-C

Hi-C 扩增与从全基因组得到的连接产物, 然后通过高通量测序评估其频率。如果需要广泛覆盖全基因组, Hi-C 是一个很棒的选择, 而且无需担忧分辨率。例如, 绘制肿瘤细胞染色体结构的全基因组变化 (Lieberman-Aiden *et al.*, 2009)。

提示:

- **优化文库扩增。**Hi-C 文库扩增必须生成足够的产物用于分析, 同时避免 PCR 不真实产物。为此, 应优化 PCR 循环次数 (保持在 9-15 个循环范围内)。如果不能产生足够的产物 (50 ng DNA), 应合并多个 PCR 反应, 而非增加循环次数, 通常 5 个反应就足够了 (Belton *et al.*, 2012)。
- **平衡读长。**与任何测序实验一样, 高质量的读取至关重要。读长必须是平衡长读映射相互作用的需要的最佳读长, 但不能太长, 以通过连接点进入伴侣片段。因此, 在大多数情况下, 50 bp 是最佳读数 (Belton *et al.*, 2012)。
- **选择合适的测序单元大小。**这一点对于数据分析至关重要。测序单元大小应与区域中预期相互作用的数量成反比。对于较为频繁的染色体内相互作用, 使用较小的测序单元 (bin); 对于较不频繁的染色体间相互作用, 使用较大的测序单元 (Belton *et al.*, 2012)。

Capture-C

Capture-C 将 3C 和寡核苷酸捕获技术 (OCT) 相结合, 加上高通量测序, 一次可研究数百个位点。如果既需要高分辨率, 又需要全基因组范围, Capture-C 是理想之选。例如, 分析基因组中每个疾病相关 SNP 对局部染色质结构的功能影响 (Hughes *et al.*, 2014)。

提示:

- **谨慎选择探针位置。**最好将探针靠近限制性内切酶位点, 如有可能, 探针甚至可以与该等位点重叠 (Hughes *et al.*, 2014)。
- **保持文库的复杂性。**维护文库的复杂性是当务之急。复杂的文库意味着输出中有更多高质量的交互作用。因此, 应避免任何可能降低文库复杂性的操作, 例如 Hi-C 生物素捕获 (Hughes *et al.*, 2014)。
- **观察重复区域中的错误交互。**绘图过程可以刺激实际为人工产物的这些区域 (例如假基因) 之间的强相互作用 (Hughes *et al.*, 2014)。

参考文献

- Belton JM, McCord RP, Gibcus JH, Naumova N, Zhan Y and Dekker J (2012). Hi-C: a comprehensive technique to capture the conformation of genomes. *Methods*, 58, 268-76.
- Dekker J, Rippe K, Dekker M and Kleckner N (2002). Capturing chromosome conformation. *Science*, 295, 1306-1311.
- Dekker J. (2006). The three 'C' s of chromosome conformation capture: controls, controls, controls. *Nat Methods*, 3, 17-21.
- Dostie J and Dekker J (2007). Mapping networks of physical interactions between genomic elements using 5C technology. *Nat Protoc*, 2, 988-1002.
- Dostie J, Zhan Y and Dekker J (2007). Chromosome conformation capture carbon copy technology. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 21, Unit 21.14.
- Horike S, Cai S, Miyano M, Cheng JF and Kohwi-Shigematsu T (2005). Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome. *Nat Genet*, 37, 31-40.
- Fullwood MJ, *et al.* (2009). An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome. *Nature*, 462, 58-64.
- Lieberman-Aiden E, *et al.* (2009). Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*, 326, 289-293.
- Hughes JR (August 2014). Email interview.
- Hughes JR, *et al.* (2014). Analysis of hundreds of cis-regulatory landscapes at high resolution in a single, high-throughput experiment. *Nat Genet*, 46, 205-212.
- Simonis M, Kooren J and de Laat W (2007). An evaluation of 3C-based methods to capture DNA interactions. *Nat Methods*, 11, 895-901.
- Van de Werken H, de Vree PJ, Splinter E, Holwerda SJ, Klous P, de Wit E and de Laat W (2012). 4C technology: protocols and data analysis. *Methods Enzymol*, 513, 89-112

组蛋白修饰

染色质结构、核小体定位和最终接近 DNA 进行的基因转录在很大程度上由组蛋白控制。每个核小体由两个相同的亚基组成，每个亚基含有四个组蛋白：H2A、H2B、H3 和 H4。同时，H1 作为连接组蛋白，起到稳定核小体间 DNA 的作用，但不属于核小体的组成部分。

组蛋白经过不同形式的翻译后修饰 (PTM)，致使其与 DNA 的相互作用受到影响。一些修饰破坏了组蛋白-DNA 相互作用，导致核小体解旋。在这种开放的染色质构象 (称为常染色质) 中，DNA 可以与转录复合物结合，随后基因激活。相反，加强组蛋白-DNA 相互作用的修饰会产生一种紧密排列的染色质结构，称为异染色质。在这种紧凑的形式中，转录复合物无法接近 DNA，导致基因沉默。因此，染色质重塑复合物对组蛋白的修饰改变了染色质结构和基因激活。

已发现的不同类型的组蛋白修饰至少有 9 种。乙酰化、甲基化、磷酸化和泛素化是大家最了解的，而 N-乙酰葡萄糖胺糖基化、瓜氨酸化、巴豆酰化和异构化最近才发现，还有待深入研究。每种修饰都是通过一组特定的酶将修饰基团添加到组蛋白氨基酸残基上或从组蛋白氨基酸残基上去除的。

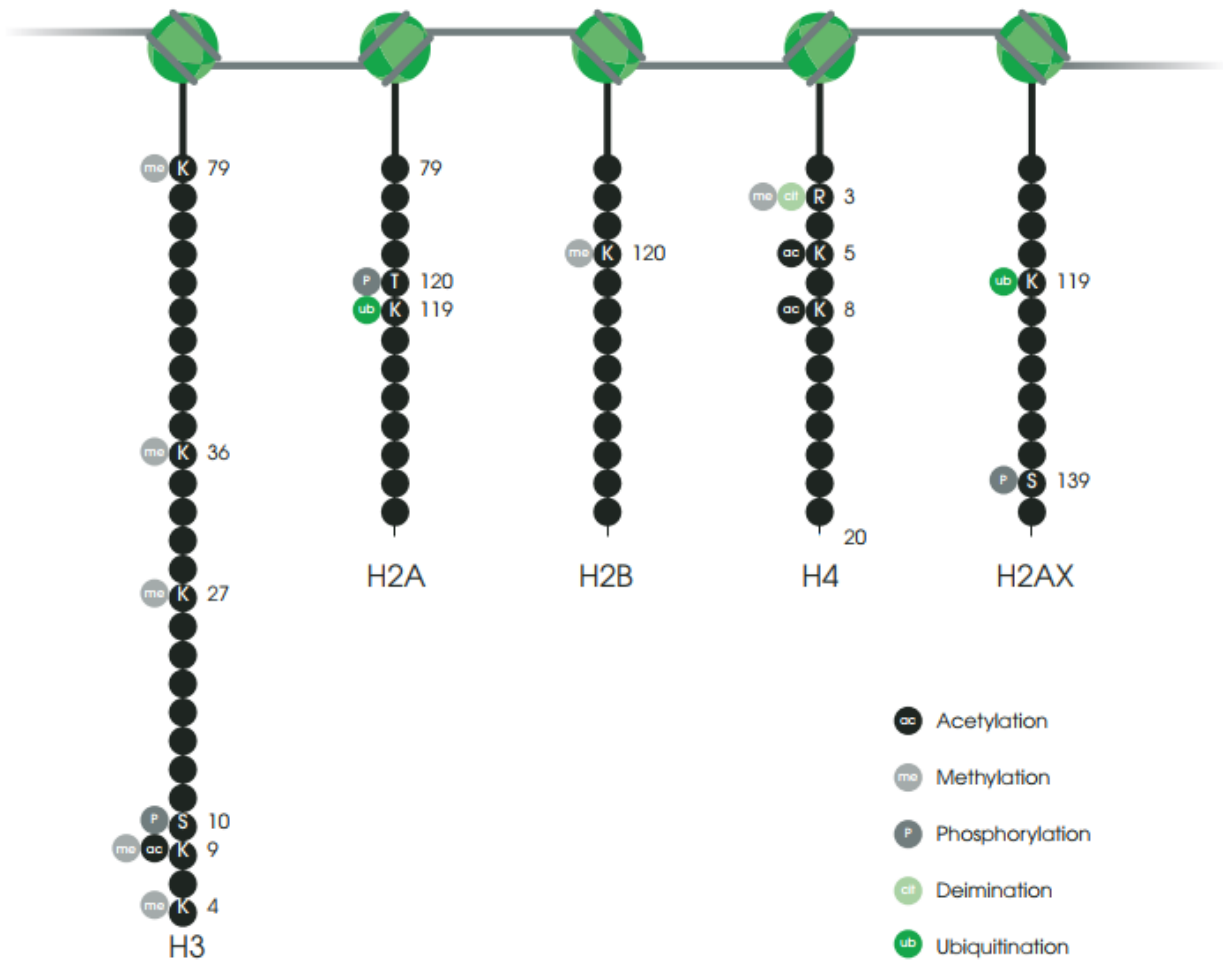


图 4: 最常见的组蛋白修饰。如欲了解更多信息, 请登录 www.abcam.com/EpigeneticsPoster 参阅我们完整的组蛋白修饰海报。

总之，这些组蛋白修饰组成了所谓的组蛋白密码，而组蛋白密码决定了局部基因组区域的转录状态。检查特定区域或整个基因组的组蛋白修饰，可以揭示基因激活状态，启动子、增强子和其他基因调控元件的位置。

组蛋白修饰详情

乙酰化

乙酰化是最早发现的影响转录调控的组蛋白修饰之一，因此目前研究的最多。乙酰化使从核小体伸出的 N-末端组蛋白尾部的赖氨酸残基带负电荷，这些负电荷会排斥带负电荷的 DNA，导致染色质结构松弛。开放的染色质构象允许转录因子结合并显著增加基因表达 (Roth *et al.*, 2001)。

组蛋白乙酰化参与细胞周期调控、细胞增殖和凋亡，并在调节细胞分化、DNA 复制和修复、核输入和神经元抑制等多种细胞过程中发挥重要作用。组蛋白乙酰化的平衡失调与肿瘤发生和癌症进展有关。

酶调节

乙酰基被组蛋白乙酰转移酶 (HAT) 添加到组蛋白 H3 和 H4 的赖氨酸残基上，并被去乙酰化酶 (HDAC) 除去。组蛋白乙酰化主要靶向启动子区域，称为启动子局部乙酰化。例如，组蛋白 H3 (H3K9ac 和 H3K27ac) 上 K9 和 K27 的乙酰化通常与活性基因的增强子和启动子有关。转录基因中也发现了低水平的整体乙酰化，但其功能尚不清楚。

甲基化

组蛋白 H3 和 H4 的赖氨酸或精氨酸残基被甲基化，对转录有不同的影响。精氨酸甲基化可以促进转录激活 (Greer *et al.*, 2012)，而赖氨酸甲基化则同时涉足转录激活和抑制，具体取决于甲基化位点。这种灵活性可以解释为甲基化不会改变组蛋白电荷，也不会直接影响组蛋白-DNA 相互作用，与乙酰化不同。

赖氨酸可以单甲基化、双甲基化或三甲基化，从而为每个甲基化位点提供进一步的功能多样性。例如，组蛋白 H3 K4 (H3K4me1 和 H3K4me3) 上的单甲基化和三甲基化都是活化标志物，但是也有着特殊的细微差别：H3K4me1 通常会标记转录增强子，而 H3K4me3 则标记基因启动子。同时，K36 (H3K36me3) 的三甲基化是与基因转录区域相关的活化标志物。

相反，组蛋白 H3 K9 和 K27 (H3K9me3 和 H3K27me3) 上的三甲基化是具有独特功能的抑制信号：H3K27me3 是控制胚胎干细胞中发育调控因子 (包括 Hox 和 Sox 基因) 的启动子区域的一个临时信号。同时，H3K9me3 是在具有串联重复结构的基因贫乏染色体区域形成异染色质的永久信号，如卫星重复序列、端粒和近着丝粒区。它也标记反转录转座子和特定的锌指基因家族 (KRAB-ZFPs)。这两个标记均在失活的 X 染色体上发现，其中，H3K27me3 位于基因间和沉默的编码区，H3K9me3 主要位于活性基因的编码区。

酶调节

组蛋白甲基化是一种可以通过多次细胞分裂而仍然保持的稳定标记，多年来一直被认为不可逆。但是，最新研究发现，它是一个主动调控和可逆的过程。

甲基化：组蛋白甲基转移酶 (HMTs)

- 赖氨酸
 - 包含 SET 结构域 (组蛋白尾部)
 - 包含非 SET 结构域 (组蛋白核心)
- 精氨酸
 - PRMT (蛋白质精氨酸甲基转移酶) 家族

去甲基化：组蛋白脱甲基酶类

- 赖氨酸
 - KDM1/LSD1 (赖氨酸特异性脱甲基酶 1)
 - JmjC (包含 Jumonji 域)
- 精氨酸
 - PAD4/PADI4

磷酸化

组蛋白磷酸化是细胞分裂、转录调控和 DNA 损伤修复过程中染色体浓缩的关键中间步骤 (Rossetto *et al.*, 2012, Kschonsak *et al.*, 2015)。与乙酰化和甲基化不同，组蛋白磷酸化建立了其他组蛋白修饰之间的相互作用，并充当效应蛋白的平台，导致下游级联事件。

磷酸化发生在所有核心组蛋白上，并且对每一个核心组蛋白都有不同的作用。组蛋白 H3 在丝氨酸 10 和 28 上的磷酸化，以及组蛋白 H2A 在 T120 上的磷酸化参与了染色质致密化以及有丝分裂过程中染色质结构和功能的调节。这些是细胞周期和细胞生长的重要标志，在真核生物中得以保留。S139 处 H2AX 的磷酸化 (产生 γ H2AX) 作为 DNA 损伤修复蛋白的招募点 (Lowndes *et al.*, 2005, Pinto *et al.*, 2010), 是 DNA 双链断裂后最早发生的事件之一。目前对 H2B 磷酸化的研究还不够深入, 但发现 H2B 磷酸化可促进凋亡相关的染色质浓缩、DNA 断裂和细胞死亡 (Füllgrabe *et al.*, 2010)。

泛素化

所有组蛋白核心蛋白都可以被泛素化，但 H2A 和 H2B 是最常见的，也是细胞核中泛素化程度最高的两种蛋白 (Cao *et al.*, 2012)。组蛋白泛素化在 DNA 损伤反应中起核心作用。

在 DNA 双链断裂位点发现了组蛋白 H2A、H2B 和 H2AX 的单泛素化。最常见的形式是 H2A 上 K119 和 H2B 上 K123 (酵母) /K120 (脊椎动物) 的单泛素化。H2A 单泛素化与基因沉默有关，而 H2B 与转录激活有关。

多聚泛素化较少见，但在 DNA 修复中也很重要。H2A 和 H2AX 在 K63 上的多聚泛素化为 DNA 修复蛋白 (如 RAP80) 提供了一个识别位点。

酶调节

与其他组蛋白修饰一样，H2A 和 H2B 的单泛素化具有可逆性，并受到组蛋白泛素连接酶和去泛素化酶的严密调控。

单泛素化

- H2A: 多梳蛋白家族
- H2B: Bre1 (酵母) 及其同系物 RNF20/RNF40 (哺乳动物)

多聚泛素化

- H2A/H2AX K63: RNF8/RNF168

组蛋白修饰快速参考指南

最常见的组蛋白修饰及发现位置:

组蛋白修饰	功能	位点
H3K4me1	活化	增强子
H3K4me3	活化	启动子
H3K36me3	活化	基因体
H3K79me2	活化	基因体
H3K9Ac	活化	增强子、启动子
H3K27Ac	活化	增强子、启动子
H4K16Ac	活化	重复序列
H3K27me3	阻遏	启动子, 基因富集区域
H3K9me3	阻遏	卫星重复序列、端粒、近着丝粒区
γ H2A.X	DNA 复制	DNA 双链断裂
H3S10P	DNA 复制	有丝分裂染色体

通过 ChIP 研究组蛋白修饰

ChIP 使用抗体来分离蛋白质或目标修饰，以及它所结合的 DNA (图 5)。然后对 DNA 进行测序，并将其定位到基因组，以确定蛋白质或修饰的位置和丰度。

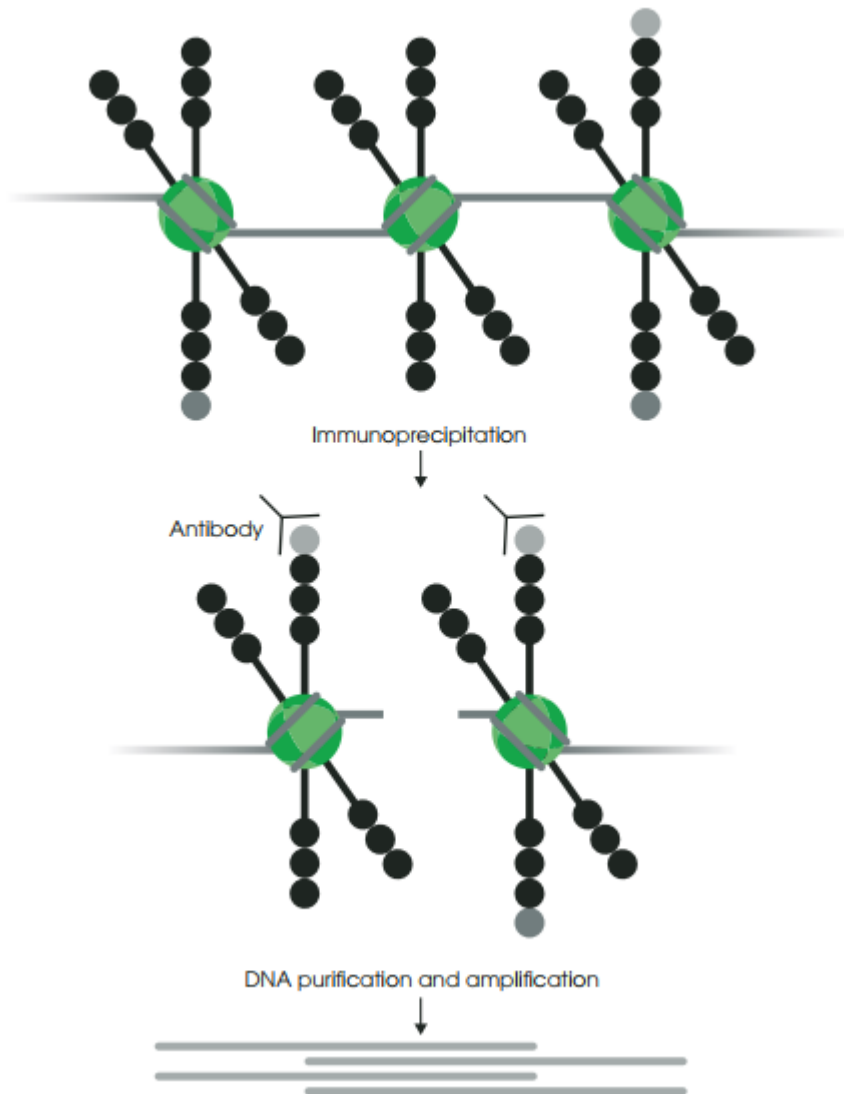


图 5: 组蛋白修饰 ChIP。 抗体直接结合到修饰的组蛋白尾部。免疫沉淀和 DNA 纯化可以分离和鉴定修饰所占据的基因组区域。

在 ChIP 实验中利用靶向特定组蛋白和组蛋白修饰的抗体可以揭示

- 高级染色质结构的特定位置，例如 H3K9me3 标记异染色质和卫星重复序列
- 活跃或沉默基因和遗传程序的特定位置，例如 AH3K9ac 标记基因激活
- 诸如启动子和增强子等遗传元件的特定位置，例如基因富集区域的 H3K27me3 标记启动子、H3K4me1 标记活性增强子

如果知晓组蛋白修饰的功能，ChIP 就可以识别具有这种组蛋白修饰标记的特定基因和区域，及其在整个基因组中的对应功能。然后可以进一步检测这些基因和区域在生物学过程中的作用。例如，针对 H3K4me1，使用 ChIP 可以揭示整个基因组中活性增强子的位置和序列，并指明目的基因和遗传程序。

或者，如果不知道组蛋白修饰的功能，ChIP 可以识别具有这一特定修饰的序列、基因和位置，然后利用这些信息来推断修饰的功能。这种技术是解码许多组蛋白密码的关键，并且在探究新发现的修饰（如泛素化）和其他新标记的功能方面也具备一定的价值。

组蛋白修饰酶：writers 和 erasers

组蛋白修饰是通过特定的酶以动态方式从组蛋白中添加和去除的（表 1）。这些 writers 和 erasers 之间的平衡决定了哪些标记存在于组蛋白上，以及处于什么水平，最终控制特定的遗传程序及其编排的细胞过程处于开启还是关闭状态。

表 1: 组蛋白 writers 和 erasers 的主要类别。

修饰	Writers	Erasers
乙酰化	组蛋白乙酰转移酶 (HATs)	组蛋白去乙酰化酶 (HDAC)
甲基化	组蛋白甲基转移酶 (HMTs/KMTs) 和蛋白精氨酸甲基转移酶 (PRMTs)	赖氨酸去甲基酶 (KDMs)
磷酸化	激酶类	磷酸酶类

关于组蛋白修饰的 readers、writers 和 erasers 的更多信息，请登录 www.abcam.com/EpigeneticsPoster 查阅我们的**表观遗传修饰海报**。

识别修饰途径和起作用的特定 writers 和 erasers 可以揭示

- **更深层次的相关细胞通路、遗传程序和生理效应研究。**例如，组蛋白去乙酰化酶 (HDACs) 激活免疫发育通路，而组蛋白乙酰转移酶 (HATs) 在分化和增殖中发挥关键作用。
- **由于 writers 和 erasers 失衡所导致的遗传程序和相应的疾病过程改变。**表征这些失衡和涉及的特定酶可以为人们了解从癌症到自身免疫性疾病的病理学提供重要见解。
- **新的药物靶点和治疗策略。**一旦发现失衡，就可以开发药物来影响这些酶的活性并纠正失衡，为医学上至今难以攻克的疾病提供新的治疗策略。例如，许多 HDAC 抑制剂正在开发中，作为对抗癌症和炎症性疾病（如关节炎和 I 型糖尿病）的新型药物。

对于药物开发活动，根据对 writers 和 erasers 活性的影响，很容易筛选到相应的化合物。

表征组蛋白甲基化通路

一般来说，开发组蛋白甲基转移酶 (HMT) 检测试剂盒充满挑战；大多数检测试剂盒存在几个缺点，原因出在检测试剂盒的设计上。典型 HMT 检测试剂盒用 3H-SAM 作甲基供体，并将 S-腺苷高半胱氨酸 (SAH) 测定为甲基化反应的一般副产物。但是，这需要

- 处理放射性物质
- 较高的灵敏度，以克服甲基供体 SAM 的低 k_{cat} (转化数通常 $< 1 \text{ min}^{-1}$) 和 K_m 值
- 预先纯化酶/蛋白复合物，以评估特定 HMTs 的活性

Abcam HMT 活性检测试剂盒克服了这些困难，采用检测特定甲基化产物的抗体来评估特定 HMT 的活性，可确保：

- 比色或荧光检测简便，无放射性
- 与核提取物或纯化蛋白的相容性（检测试剂盒对目标修饰具有特异性）
- 3 小时内即可提供数据

有关我们组蛋白甲基化检测试剂盒的更多信息，请登录 www.abcam.com/HistoneMethylationAssays 查看

表征去甲基酶活性

组蛋白去甲基化酶活性检测试剂盒通常测定甲醛（去甲基作用的副产物）的形成。因此，易受洗涤剂、巯基和一系列离子的干扰。与甲基化检测试剂盒类似，这些检测试剂盒对任何去甲基化酶都没有特异性，只能用纯化的蛋白进行检测。

Abcam 的组蛋白去甲基化酶检测试剂盒通过直接测定去甲基化产物的形成来规避这些问题，可确保：

- 灵敏度比基于甲醛的检测试剂盒更高（20 - 1,000 倍）
- 无硫醇、洗涤剂或离子干扰的更准确的数据
- 与核提取物或纯化蛋白的相容性（得益于该检测试剂盒对目标修饰的特异性）
- 测定广泛物种（包括哺乳动物细胞/组织、植物和细菌）的去甲基化酶活性
- 具有简单比色或荧光读数的快速微孔板版本
- 3 小时内即可提供数据

有关我们组蛋白去甲基化酶检测试剂盒的更多信息，请登录

www.abcam.com/HistoneMethylationAssays 查看

表征组蛋白乙酰化通路

Abcam 提供可分析总体活性以及 H4 特异性的 HAT 活性的试剂盒。这些检测试剂盒可以检测 HAT 催化乙酰基从乙酰辅酶 a 供体转移到组蛋白肽的过程，该过程会生成乙酰化肽和 CoA-SH。然后通过比色法或荧光法测定 CoA-SH 副产物：

- 比色法 - CoA-SH 作为生成 NADH 的必需辅酶，与可溶性四唑染料反应生成可通过分光光度法检测的产物。比色法是动力学研究的理想选择，支持连续检测。
- 荧光法 - CoA-SH 与显色剂和探针反应生成可通过荧光检测的产物。

表征组蛋白去乙酰化酶活性

根据功能和 DNA 序列相似性，HDAC 蛋白可分为四大类（I 类、IIA 类、IIB 类、III 类、IV 类）。I 类、IIA 类和 IIB 类被视为“经典”HDAC，其活性被曲古抑菌素 A (TSA) 抑制，而 III 类是 NAD⁺ 依赖性蛋白家族 (sirtuins-SIRTs)，不受 TSA 影响。由于 IV 类仅与其他类存在 DNA 序列相似性，因此被单独视为非典型类。

这些类别中的每一类都与不同的细胞程序相关，可以用不同的荧光法进行单独测定。例如，SIRT 通常与癌症和神经系统疾病相关。检测 SIRT 活性，或发现影响 SIRT 活性的药物，可能有望找到这些疾病的新诊断或治疗策略。

荧光法使用的是乙酰化肽底物，该底物的氨基端和羧基端有荧光基团和淬灭基团。底物一旦去乙酰化，就会被肽酶裂解，将荧光基团从淬灭剂中释放出来。随后荧光团荧光强度的增加与去乙酰化酶活性成正比。

抑制 writers 和 erasers

先用小分子抑制这些修饰酶，再评估下游后果，进而探测组蛋白修饰的参与和生物学功能，这非常有用。因此，writers 和 erasers 的抑制剂是理解表观遗传修饰通路作用的关键工具。在学术和行业临床前研究的背景下，这些抑制剂对“可成药”靶标的验证也至关重要。

登录 www.abcam.com/HistoneWriterEraserInhibitors 了解关于我们组蛋白甲基转移酶和去甲基化酶抑制剂系列产品的更多信息。

组蛋白修饰 readers/translators

组蛋白通过直接修饰（例如，乙酰基团排斥带负电荷的 DNA，以产生开放染色质构象）或称为效应物的蛋白质接头来调节染色质的物理性质及其相应的转录状态。效应蛋白识别并结合特定的表观遗传标记，随后，招募分子复合物来改变染色质结构。这些表观遗传 readers 通过翻译组蛋白密码来决定组蛋白修饰的功能结果。

效应结构域识别特异性组蛋白修饰

效应蛋白通过效应结构域识别并结合组蛋白修饰标记，称为模块（表 2）。

表 2：通过模块或组蛋白结合蛋白识别组蛋白标记。

组蛋白结合或效应模块	已知组蛋白标记
染色质域	H3K4me2/3、H3K9me2/3、H3K27me2/3
Tudor 结构域	H3K4me3、H4K20me2
MBT 结构域	H3K4me1、H4K20me1/2、H1K26me1
WD40 重复序列蛋白	R2/H3K4me2
溴结构域	Kac
PHD 结构域	H3K4、H3K4me3、H3K9me3、K36me3
14-3-3	H3S10ph
BRCT 结构域	H2A.XS139

这些模块通过模块结合口袋外围的氨基酸来识别特定的组蛋白修饰。同时，该结合口袋外的残基（特别是 N+2 和 N-2 位置上的残基）决定了对被修饰的组蛋白和氨基酸残基（即 H3K4 与 H4K20）的特异性。

结合口袋内外残基的细小差异可以识别相似的表现遗传标记。例如，效应蛋白可区分单甲基化、双甲基化或三甲甲基化状态，但甲基结合模块结构略有不同。举个例子，tudor 结构域可能只结合二甲甲基化或三甲甲基化的赖氨酸，而 PHD 手指模块可能同时结合两者，或者只结合未修饰的赖氨酸 (Ruthenburg *et al.*, 2007)。

多价性使组蛋白密码复杂化

同一蛋白和/或蛋白复合物中通常存在多个组蛋白结合模块，能够识别特异性的组蛋白修饰结合位点。这使得组蛋白密码变得更加复杂化，其中组蛋白修饰之间相互作用而不是单独地发挥作用。

组蛋白修饰的多价结合对于识别具有复合特异性和增强亲和力的离散标记模式，同时实现多样且精确的下游作用非常重要。例如，单个表观遗传标记（如 H3K4me3）可能在一个环境中激活基因转录，但在另一个环境中对其进行抑制，具体取决于周围的标记。表 3 给出了不同组蛋白修饰组合的一些功能性关联的例子 (Ruthenburg *et al.*, 2007)。

表 3: 共存组蛋白和 DNA 修饰的功能关联

组蛋白标记	染色质状态
H3K4me2/3 + H4K16ac	转录活性同源异型基因
H3K4me2/3 + H3K9/14/18/23ac	转录活性染色质
H3S10ph + H3K14ac	有丝分裂刺激的转录
H3K4me3 + H3K27me3	二价结构域
H3K9me3 + H3K27me3 + 5mC	沉默位点
H3K27me3 + H2AK119ub1	沉默同源异型基因
H3K9me3 + H4K20me3 + 5mC	异染色质
H3K9me2/3 + H4K20me1 + H4K27me3 + 5mC	失活 X 染色体

一个蛋白或复合物中的多个效应模块可能在相同或整个组蛋白和/或核小体上与组蛋白修饰相互作用。这些相互作用可分为：

核小体内相互作用：与相同核小体结合

- 顺式组蛋白：与相同组蛋白尾部结合
- 反式组蛋白：与不同组蛋白尾部结合

核小体间相互作用：与不同核小体结合

- 相邻桥接：与相邻核小体桥接
- 不连续桥接：与非相邻核小体桥接

参考文献

- Cao, J. & Yan, Q. Histone ubiquitination and deubiquitination in transcription, DNA damage response, and cancer. *Front. Oncol.* 2, 26 (2012).
- Füllgrabe, J., Hajji, N. & Joseph, B. Cracking the death code: apoptosis-related histone modifications. *Cell Death Differ.* 17, 1238-1243 (2010).
- Greer, E. L. & Shi, Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat. Rev. Genet.* 13, 343-57 (2012).
- Kschonsak, M. & Haering, C. H. Shaping mitotic chromosomes: From classical concepts to molecular mechanisms. *BioEssays* 755-766 (2015)
- Lowndes, N. F. & Toh, G. W.-L. DNA repair: the importance of phosphorylating histone H2AX. *Curr. Biol.* 15, R99-R102 (2005).
- Pinto, D. M. S. & Flaus, A. Structure and function of histone H2AX. *Subcell. Biochem.* 50, 55-78 (2010).
- Rossetto, D., Avvakumov, N. & Côté, J. Histone phosphorylation: A chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics* 7, 1098-1108 (2012)
- Roth, S.Y., Denu, J. M. & Allis, C. D. Histone acetyltransferases. *Annu.Rev. Biochem.* 70, 81-120 (2001)
- Ruthenburg, A.J., Li, H., Taverna, S.D., Patel, D.J.& Allis, C.D. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8, (2007)

通过 ChIP 研究表观遗传学

染色质免疫沉淀 (Chromatin immunoprecipitation, ChIP) 是一项强大的技术, 研究人员可以在自然条件下检测表观遗传调控因子与 DNA 之间的相互作用。利用 ChIP, 研究人员可在整个基因组内识别目的蛋白结合的特定基因和序列, 为其调控功能和机制提供关键线索。通过解析蛋白质-DNA 相互作用的时间和空间动态, ChIP 提供了对核心生物学过程和疾病病理学的见解。

ChIP 用途极广, 可在多种应用中使用。从查看序列特异性蛋白结合到整体调控过程, ChIP 为研究人员提供了整合发现和绘制复杂表观遗传调控系统全貌的工具。

ChIP 的应用

ChIP 在阐明基因调控、转录机器和染色质结构方面发挥了核心作用。下面是利用 ChIP 可以检测的一些关键蛋白。

转录因子

通过检测特定转录因子在基因组中的结合位置和时间, 研究人员已经确定了特异性结合位点和序列, 精确定位了下游基因激活, 并揭示了转录因子的全基因组调控程序。

通过 ChIP 和其他方法进行的进一步研究, 揭示了这些转录因子是疾病病理学背后的主要调控者, 参与编排了导致癌症、自身免疫性疾病、过敏和许多其他疾病的表观遗传失调。通过识别这些主调控因子及其下游的遗传程序, ChIP 为多种疾病的诊断和治疗策略提供了新的靶标。

转录机制

ChIP 研究检测了 RNA 聚合酶 II 以及其他转录组分的结合位点, 揭示了启动子和增强子序列以及转录调控的新机制。

染色质结构

ChIP 研究在组蛋白密码的发现和表征方面起着关键作用。通过绘制特定组蛋白修饰的结合位置, 并与已知的基因激活状态进行比较, 研究人员已经记录了特定组蛋白残基上的乙酰化或甲基化如何影响基因激活或沉默以及高阶染色质结构。通过 ChIP, 这些组蛋白修饰特征可以用来预测表观遗传调控在特定基因组区域的那些特性。

随着新组蛋白修饰和染色质调控元件的发现, 在基因组调控中, ChIP 仍然是揭示这些元件的功能及其相互作用复杂性的重要工具。

组合分析

将多种蛋白质的 ChIP 分析结合起来, 是构建基因组调控全貌的有效方法。通过该方法, 研究人员能够研究不同类型的蛋白及蛋白复合物如何在空间和时间上在特定基因或基因组上的特定位点进行相互作用, 从而调控基因转录 (Barski *et al.*, 2007)。

ChIP 拓展了表观遗传学研究的范围和精度

ChIP 有助于在多种尺度上分析表观遗传机制，精确性极佳。下面是可以利用 ChIP 实现的内容。

局部表观遗传机制

- 将目的蛋白定位到特定的目的基因或基因组区域
- 识别目的蛋白的特异性结合位点序列

全基因组表观遗传程序设计

- 将目的蛋白（如转录因子）定位到其在基因组中的所有结合位点
- 跨位点确定蛋白位置和染色质特征
- 比较不同条件下某一蛋白-蛋白修饰（如组蛋白乙酰化）在不同位点的富集情况

动态表观遗传过程

- 一段时间内定量可诱导基因处结合的蛋白/蛋白修饰
- 通过比较不同细胞状态、条件和时间点的 ChIP 结果，揭示生物学过程中涉及的表观遗传调控和失调的基本机制。
- 不同的组织揭示了负责分化和细胞特异性功能的表观遗传程序和基因。
- 不同的细胞周期状态揭示了负责细胞增殖和细胞周期控制的表观遗传程序和基因以及其对发育过程和癌症病理的预示。
- 对比疾病与健康细胞可识别出失调的关键基因和程序，揭示潜在的疾病病理和新的诊疗靶点
- 对比治疗和未治疗状态可揭示某些治疗或状况是否可以有效纠正构成疾病病理基础的表观遗传失调

实验方案概述：ChIP 是如何工作的？

ChIP 方案是利用抗体免疫沉淀目的蛋白及其结合的 DNA，然后回收纯化 DNA，并通过 PCR、微阵列或测序进行分析，以确定基因组序列和蛋白结合位置。

ChIP 流程可分为 5 个基本部分（图 6）：

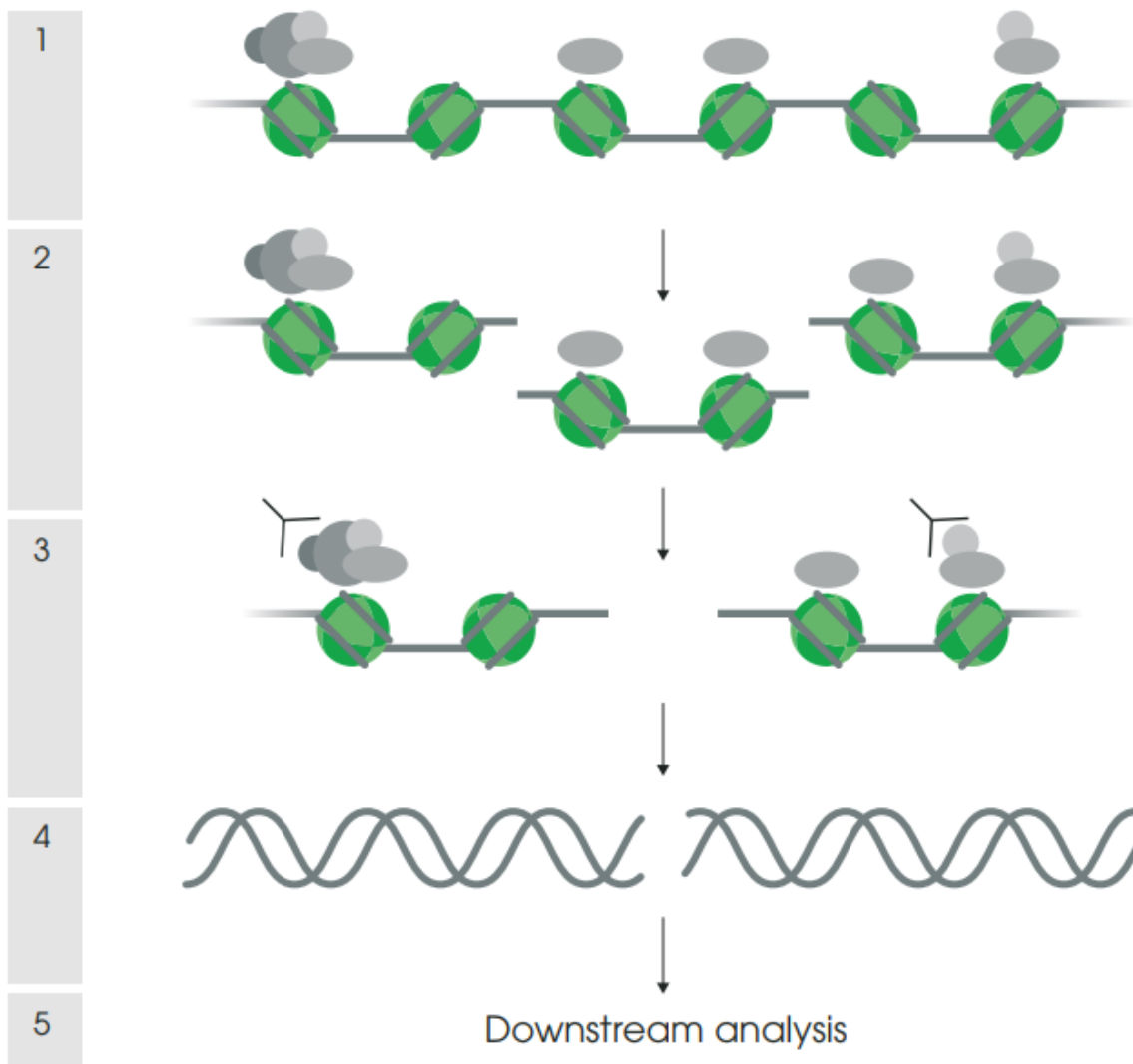


图 6: ChIP 方案工作流程。

1. DNA 和蛋白质交联 (X-ChIP)
2. 通过超声处理 (X-ChIP) 或酶法 (N-ChIP) 进行染色质片段化
3. 与目的蛋白/修饰相互作用的染色质片段的免疫沉淀
4. 逆转交联 (X-ChIP) 和 DNA 纯化
5. 分析获得的 DNA，以确定靶序列相对于 Input 的丰度

1. 交联

在某些情况下，可能需要将 DNA 和蛋白质交联来稳定其相互作用，特别是以蛋白复合物身份参与相互作用但并不直接接触 DNA 的蛋白质。交联可以在特定的时间点固定冻结这些分子间的相互作用，这种 ChIP 称为交联 ChIP (X-ChIP)。相反，自然 ChIP (N-ChIP) 无需预先交联。

交联一般用甲醛进行，甲醛可使蛋白质与 DNA、RNA 和其他蛋白质发生可逆性交联。其他化学物质，如顺铂，只能用于 DNA 和蛋白质之间的选择性交联。研究 DNA 和特别大的蛋白质/RNA 复合物之间的相互作用时，可能需要用额外的试剂进行双重交联。UV 交联是不可逆的，因此与 ChIP 不兼容。

2. 染色质片段化

染色质必须片段化，才能进行有效的免疫沉淀，并将靶抗原精确地定位到基因组上。DNA 片段的大小将最终决定基因组图谱的分辨率，因此优化片段化方案很重要。

- N-ChIP 提供最高分辨率的图谱，酶消化产生单个核小体大小为 175 个碱基对的片段。
- X-ChIP 依靠超声处理产生理想的片段大小，即 200-1000 个碱基对。

步骤 1 和步骤 2 的优化对于获得最高质量的 DNA 并用于后续的 ChIP 分析是非常重要的。

3. 免疫沉淀

目的蛋白及其结合的 DNA 片段被免疫沉淀。利用琼脂糖微珠或磁珠将染色质混合物与目的蛋白及抗体在 4°C 条件下一起孵育过夜，形成微珠/抗体/蛋白/DNA 复合物。然后通过离心收集 Protein A、Protein G 或 Protein A/G 琼脂糖微珠，或通过磁管架收集磁珠，从而免疫沉淀抗体/蛋白/DNA 复合物。非特异性结合在后续洗涤过程中去除。

4. DNA 回收和纯化

通过 SDS 和加热，从微珠上洗脱抗体/蛋白质/DNA 复合物。X-ChIP 接着必须通过氯化钠和加热逆转蛋白质和 DNA 的交联。然后用蛋白酶 K 和 RNase A 降解存在的任何蛋白质和 RNA，剩余的 DNA 用酚氯仿抽提或 PCR 纯化试剂盒纯化。

您可以登录 www.abcam.com/X-ChIP 查看我们的完整 X-ChIP 实验方案

也可以登录 www.abcam.com/N-ChIP 查看我们的 N-ChIP 实验方案

5. 分析 DNA

接下来通过 qPCR、杂交阵列 (ChIP-on-Chip) 或新一代测序 (ChIP-seq) 分析纯化的 DNA，以识别并定量已被免疫沉淀的序列。这些序列被定位到基因组，以确定目的蛋白结合的基因和区域。

样本制备：X-ChIP 与 N-ChIP

交联的目的在于将靶抗原固定在其染色质结合位点上。组蛋白本身一般不需要交联，因为它们已经与 DNA 紧密相连。其他亲和力较弱的 DNA 结合蛋白或组蛋白可能需要交联才能将固定到位。

- ChIP 用于组蛋白修饰研究时需要交联的可能性不大
- DNA 结合复合物中所含的转录因子和蛋白等非组蛋白研究时很可能需要交联
- 距离相互作用的目标 DNA 越远，没有交联的 ChIP 效率就越低

染色质片段化差异

N-ChIP 和 X-ChIP 都需要通过染色质片段化来使相互作用的蛋白/DNA 复合物容易被抗体接近，可以通过利用微球菌核酸酶或超声处理来片段化 (Neill *et al.*, 2003)。

N-ChIP

对于 N-ChIP 实验，用微球菌核酸酶进行酶消化应该足以将您的样本分解成单个核小体片段（含有大约 175 个碱基对 DNA 的单体）。

- 纯化的核小体单体不适合分析转录因子及某些染色质结合子的相互作用，这些转录因子通常与核小体间 DNA 结合。建议在这些情况下进行超声处理。
- 核小体是动态的，可能在酶消化过程中重排。这会给基因组特定区域的绘制带来一定的问题，并且任何变化都应该用合适的对照来监测（见定量 PCR 的检测对照）。在没有交联的情况下，应将 X-ChIP 用作对照，以评估任何动态变化和不需要变化。
- 酶切不会产生完全随机的染色质片段。微球菌核酸酶对基因组序列的某些区域有倾向性，造成对 DNA 的消化不均匀或不相同。某些位点可能被过度表达，而其他位点可能不存在，这将影响数据的准确性。
- 为了确保消化的一致性，购买原液酶后务必进行分装，并在每次进行实验时，使用新的分装原液酶进行时间梯度消化。虽然存储过程中，酶的质量可能会随着时间的推移发生变化，但染色质制备中的变化风险（压缩程度等）会更高；新的染色质样本制备过程不能简单和之前处理的其他样本相同。

X-ChIP

甲醛交联限制了微球菌核酸酶等酶接近其靶点，使得酶消化在 X-ChIP 实验中不起作用。取而代之的是通过超声处理产生 500-700 碱基对（2-3 个核小体）的随机 DNA 片段。

- 避免起泡，起泡会减少溶液内的能量转移，降低超声效率。超声处理也可能受到交联时间、细胞密度或细胞类型的影响。
- 超声处理的染色质可以在液氮中快速冷冻并在 -80°C 下保存长达 2 个月，但要避免反复冻融。
- 尽管超声处理理论上不会有切割倾向性，但实际上很少如此。
- DNA 片段通常较大，会影响检测的分辨率。但是，长达 1.5 kb 大小片段的分辨率能实现 ChIP 的多数目的。微球菌核酸酶消化结合超声处理可提高分辨率，对温和或不完全交联的样本可能有用。

无论选择哪种片段化方法，重要的是，在设置实验时，应始终优化片段化时间，以优化片段大小。

表 4: N-ChIP 相对 X-ChIP 的优缺点。

	N-ChIP	X-ChIP
优势	高效沉淀 DNA 和组蛋白	适用于非组蛋白。可对所有细胞类型、组织和生物体进行检测。
	结合特异性的可预测性更高	实现 DNA-蛋白质、RNA-蛋白质和蛋白质-蛋白质交联
	高分辨率（约 175 bp/单核小体）	减少染色质重排的机会
缺点	仅适用于组蛋白	过度固定会妨碍有效的超声处理
	Input 染色质不同可能产生不同选择性核酸酶消化	甲醛可能改变抗原的结合特性
	高浓度的核酸酶可能过度消化染色质	与 N-ChIP 相比，分辨率较低

抗体选择

并不是所有的抗体都适合 ChIP 实验，而且很多抗体不符合 ChIP 质量要求或未经过 ChIP 应用验证。选择合适的 ChIP 级抗体对您成功地进行 ChIP 实验而言至关重要。

如果没有市售抗体，或者您想尝试一种尚未经 ChIP 测试的抗体：

- 验证 IP、IHC 或 ICC 应用的抗体都是很好的选择。类似于 ChIP，这些应用可识别蛋白的天然构象，而蛋白质免疫印迹抗体可能只能识别蛋白的线性结构。
- 抗体特异性是一个重要问题，在应用于 ChIP 实验前应充分验证。
- 理想情况下，ChIP 的抗体应经过亲和纯化。

对照

ChIP 方案 and 数据分析可能较为复杂，因此添加正确的对照来确保实验正常进行非常重要。

样本对照

设置未进行免疫沉淀的 Input 样本对照，以便与免疫沉淀样本结果进行比较，这一点至关重要。这种比较最终会使数据标准化，以提供可解释的结果。

对组蛋白修饰进行免疫共沉淀时，纯化的组蛋白 H3 和 H1 可以作为组蛋白制备质量的阳性对照（组蛋白 H1 常用于 X-ChIP）。

抗体对照

不同的抗体对照对于确保免疫沉淀成功以及排除污染可能性而言非常重要。下面是关键对照的部分示例：

- 活性基因位点的阳性对照：H3K4me3 和 H3K9ac
- 沉默基因位点的阴性对照：H3K9me3、H3K9me 和 H3K27me3
- 非染色质表位的阴性对照：抗-GFP 抗体
- 阴性 IP 对照：同型 IgG 抗体或仅加微珠对照

染色质重塑也可能会移动或移除特定位置的组蛋白（例如活性启动子位点）。为了确认核小体保留在特定基因组位点，应使用针对非修饰组蛋白（如组蛋白 H3）的对照抗体。分析组蛋白修饰时，用抗组蛋白 H3 抗体为组蛋白研究标准化。

定量 PCR 对照

如果通过 qPCR 分析数据，则需要额外的对照，以确保数据分析的质量。基因组的某些区域会比其他区域纯化效果更好，并且一些核小体在酶促断裂过程中可能发生重排。因此，针对 Input 以及 ChIP 纯化后 DNA 的多个区域设计 PCR 引物，避免虚假结果。裂解起始细胞，制备 Input，并取样用于 ChIP 实验的平行对照。

此外，在 qPCR 阶段，对您知道应该或不应该结合目的蛋白的基因组位点进行阳性和阴性对照 qPCR 至关重要。此外，还有必要进行不加模板对照 qPCR，作为阴性对照，以确保 PCR 过程中没有污染。

方案优化

ChIP 方案必须对多个步骤进行优化才能达到最佳效果。以下是您需要进行额外优化的内容，优化后才能获得最佳 ChIP 结果。

交联 (仅 X-ChIP)。

甲醛推荐用于可逆交联。甲醛是一种高效的 DNA-蛋白质交联剂，但不是一种有效的蛋白质-蛋白质交联剂，因此很难对不与 DNA 直接结合的蛋白质进行 ChIP 分析。其他交联剂可用于不同距离分子间的交联。

交联过程对时间要求严格，通常是几分钟。过度交联会产生多个问题，包括抗原可及性和超声效率降低。举个例子，抗原决定簇可能被掩盖或改变，导致抗体与抗原的结合减少。

- 始终通过设置交联时间梯度 (2 至 30 分钟交联) 优化交联条件
- 淬灭甲醛，用甘氨酸终止交联反应
- 蛋白质和 DNA 之间的交联可以被蛋白酶 K 破坏，蛋白酶 K 会切断脂肪族和芳香族氨基酸羧基附近的肽键，进一步帮助 DNA 纯化

染色质片段化

将染色质切割成适当大小至关重要。片段大小应小于 1kb，但最好为 200-1000 bp。通过 MNase 酶切将片段切割成单核小体水平 (175 bp)，可以实现最佳分辨率。设置酶切消化时间梯度摸索最佳消化时间 (2-30 min)，纯化 DNA 凝胶电泳，以确定达到最佳 DNA 片段大小的条件和时间 (图 7)。N-ChIP 和 X-ChIP 都需要优化片段化时间。

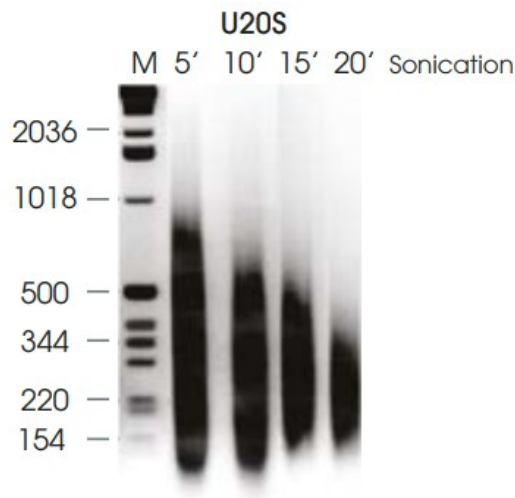


图 7：超声时间梯度实验示例。对 U2OS 细胞进行 5、10、15 和 20 分钟的超声处理。逆转交联并在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳纯化的 DNA。片段大小随着超声时间增加而不断减小。15 分钟时观察到最佳片段大小。

抗体浓度

抗体的效价对优化信噪比有重要意义。以每 25-35 mg 纯化核小体单体加 3-5 μg 抗体为起始量。对于定量 ChIP，您可能需要染色质和抗体等量匹配。ChIP 通常需要大量的一抗（每 μg 微珠需要 1-10 μg 一抗）。与许多实验技术一样，必须在实验开始时优化抗体的用量。

洗涤缓冲液

确定洗涤步骤中缓冲液组分的合理浓度，通常是 250-500 mM 氯化钠或氯化钾。盐和洗涤剂的浓度越高，洗涤结果越好。但是，必须在低背景和对靶标的破坏之间取得平衡。如果缓冲液过强，会破坏特异性抗体相互作用，导致信号偏低。如果缓冲液不够强，非特异性的相互作用将仍然存在，导致高背景。NP-40 可作为去污剂，而 X-ChIP 常用 RIPA 缓冲液。

低细胞数的 ChIP

标准 ChIP 工作流程需要大量的细胞。需将约 10^6 至 10^7 个细胞作为起始材料，如果低于该细胞量，检测会受到高背景结合、低富集效率和富集文库复杂性丧失影响。但是，获得这么大的样本量很难，特别是在检查像转基因小鼠组织或临床样本这种珍贵的样本类型时。可以应用一些策略解决样本含量少的问题。

1. 提高富集效率，最大限度地减少样本损失

对 ChIP 工作流程作出一些调整可以提高富集效率，并最大限度地减少低 Input 样本的样本损失 (Mao *et al.*, 2013 and Dirks *et al.*, 2016)。

- 着重考虑样本本身的质量和属性。具体来说，在福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 样本中，过度交联会引发一些问题。从 FFPE 样本中提取可溶性染色质可能有助于解决这些问题 (Cejas *et al.*, 2016)。
- 抗原浓度低 IP 效果差，可通过调节缓冲液 pH 值、离子强度和孵育时间等变量的方式进行优化 (Reverberi *et al.*, 2007)。
- DNA 片段大小分布广泛，阻碍了低 Input ChIP 的分析，可通过超声处理和/或 MNase 消化进行补救，以确保片段化更均匀 (Gilfillian *et al.*, 2012)。
- 虽然有时会将细菌 DNA 用作封闭剂来降低标准 ChIP 的背景，但不建议在低 Input ChIP 中使用细菌 DNA，因为其会贯穿整个检测过程并干扰数据分析。其他封闭剂如惰性蛋白或 mRNA 可以减少低 Input ChIP 中的背景结合，而不污染数据。
- 将检测试剂盒小型化为微孔板形式可以促进自动化，并在 IP 工作流程中提高抗原浓度（如靶转录因子）– 这样可以避免低抗原浓度的“稀释效应”，避免“稀释效应”导致的抗体-抗原复合物的解离和 ChIP 效率的降低。
- 在各个检测步骤完成后进行磁珠纯化而非基于酚的提取最大限度的保留样本。

Abcam 的高灵敏度 ChIP 检测试剂盒采用独特的嵌合蛋白来捕获抗体/蛋白/ DNA 复合物，具有以下显著优势：

- 抗体捕获蛋白比 Protein A 或 Protein G 更小，并在微量滴定板孔的表面以高密度包被，可以在更小的区域内结合更高数量的 IgG，从而确保洗脱 DNA 的效率和浓度。
- 嵌合捕获蛋白在更广的 pH 和盐浓度范围内均表现出优秀的稳定性，适用更严格的洗涤条件。
- 最低只需 2×10^3 个细胞或 0.5 mg 组织即可成功运行 ChIP
- 相对富集程度大于 500 倍
- 快速实验方案，从细胞/组织到富集 DNA 仅需 5 小时
- 微孔板检测形式，可灵活地进行样本通量和自动化（可用于单孔板、8 孔板或 96 孔板形式）

2. 读数和下游数据处理平台

除了检测本身，下游处理（即测序、阵列或 PCR）和生物信息学分析的选择与优化同样重要。

- 检测平台也会影响检测试剂盒的灵敏度。ChIP 测序 (ChIP-seq) 是高灵敏度的金标准平台，其噪音始终低于 ChIP-on-chip。
- 低 Input ChIP-seq 实验过程中最常见的问题是：存在大量无法匹配的读段、PCR 重复序列以及文库复杂性较低。因此，必须通过优化接头连接对低 Input 样本的文库制备进行优化，避免扩增产生的误差和偏倚。如上所述，最大限度地提高 ChIP 富集效率也会有所帮助 (Schmidl *et al.*, 2015 and Bolduc *et al.*, 2016)。
- 为便于考虑数据中可能存在的工艺偏差，应调整生物信息学工作流程 (Kiddler *et al.*, 2011)。

组织 ChIP

检查特定组织中的表观遗传机制可以揭示组织特异性遗传编程、发育和生物过程的基本要素。ChIP 可作为检测组织特异性转录因子、基因活化和表观遗传调控的其他方面作用和机制的有效工具。对组织样本进行 ChIP 需要专门的染色质制备方案，以确保 Input 材料的质量和可靠的结果。

所需的组织用量取决于蛋白质丰度、抗体亲和力和交联效率。每次进行 ChIP 测定时，使用 5-15 μg 染色质优化以下方案，每次 ChIP 大概准备 30 mg 肝组织。开始 X-ChIP 检测之前，应确定每种组织类型的确切染色质浓度。

如欲了解更多信息，请登录 www.abcam.com/TissueChIP 查看我们来自组织样本的 ChIP 方案。

疑难解析

即使进行了优化，首次实验的结果也可能不尽完美。您可以在这里找到一些常见问题及其相应的解决方案。

不加抗体对照中出现高背景

潜在问题

与微珠非特异性结合

解决方案

增加额外洗涤或者免疫沉淀之前将超声处理的染色质与 Protein A/G 微珠一起孵育 1 小时进行预清除步骤

微珠背景高

尝试不同品牌的微珠和不同的封闭策略，了解哪种微珠和策略在您的对照中提供的背景最低

洗涤缓冲液受污染

更换缓冲液

低信号

潜在问题	解决方案
细胞未有效裂解	RIPA 缓冲液应该有良好效果
起始材料不足	ChIP 通常需要大量的 Input, 每种 IP 条件下至少有 25 μg 染色质 (3-4 百万个细胞)
染色质片段可能太小	琼脂糖凝胶电泳, 确保大小正确, 必要时再次优化片段化
抗体不足	通常 3-5 μg 即可, 但如果未观察到信号, 则可能需要高达 10 μg
单克隆抗体可能不适合, 特别是对 X-ChIP 而言, 因为交联可能会掩盖表位	尝试多克隆抗体或 ChIP 级单克隆抗体
洗涤缓冲液过强, 消除了特异性抗体结合	缓冲液中的氯化钠不得超过 500 mM。如上所述, 应对洗涤缓冲液进行优化
亲和微珠选择错误	确保抗体种类和亚型与选择的微珠结合或使用 ProteinA/G 混合微珠
如果使用的是 X-ChIP, 细胞可能交联时间过长, 降低了表位的可及性; 或者过短, 减少了 IP 过程中 DNA 的下拉	分析 DNA 亲和力较弱的蛋白质可能需要 X-ChIP, 以保持蛋白质与 DNA 的交联 此外, 还需优化交联的时间

注: 信号低可能是真的, 而且目标区域没有抗体富集。

添加阳性对照抗体和位点, 确认 ChIP 有效。抗原可能存在, 但不结合在预期的基因组位点。

整个较大区域内, 分辨率低且背景高

潜在问题	解决方案
DNA 片段可能过大	片段大小应小于 1kb, 但最好为 200-1000 bp。通过 MNase 酶切将片段切割成单核小体水平 (175 bp), 可以实现最佳分辨率。琼脂糖凝胶电泳确认, 必要时进一步优化染色质片段化步骤。

PCR 扩增问题

PCR 后, 所有样本出现高信号, 包括不加模板对照

潜在问题	解决方案
qPCR 溶液可能被污染	采用储备原液制备新溶液
样本中无 DNA 扩增	
潜在问题	解决方案
qPCR 溶液可能被污染	采用储备原液制备新溶液

还有哪些处理可能会影响我的 ChIP 结果？

一些抗体会受到浓度相对较低的 SDS 的影响。添加 TSA、丁酸盐或秋水仙胺一般不会影响 ChIP。

请勿在高转速（不超过 6,000 rpm）下离心琼脂糖凝胶微珠，高转速会压缩并损坏微珠。

如欲了解更多关于实验方案优化和疑难解析的信息，请登录

www.abcam.com/ChIPTroubleshooting 查看

ChIP 结果分析

一旦拉下的 DNA 片段被免疫沉淀和纯化，可以通过不同的方法对其进行分析。

qPCR

利用基因或靶标特异性引物扩增纯化 DNA 中已知的靶标位点

局限性：

- 必须知道靶标区域的基因组序列才能设计引物

ChIP-on-Chip

采用微阵列检查整个基因组内多个目标位点、特定结构域等的存在。扩增下拉样本和对照样本 DNA，并用互补荧光探针标记。合并样本并与目标微阵列杂交。荧光信号的比率表示目的蛋白已经结合的富集区域。

局限性：

- 需要大量细胞
- 对重复序列不敏感
- 为覆盖整个基因组，必须使用大量的阵列
- ChIP 程序完成后，易受扩增偏倚的影响
- 分辨率低于 ChIP-seq

ChIP-seq

最常用的全基因组分析方法是提高碱基对分辨率，没有 ChIP-on-Chip 所遇到的限制。扩增下拉 DNA 和对照样本 DNA，然后对片段进行高通量测序，再将其与基因组进行比对。重叠片段形成一个峰，代表目的蛋白与基因组结合的位置。

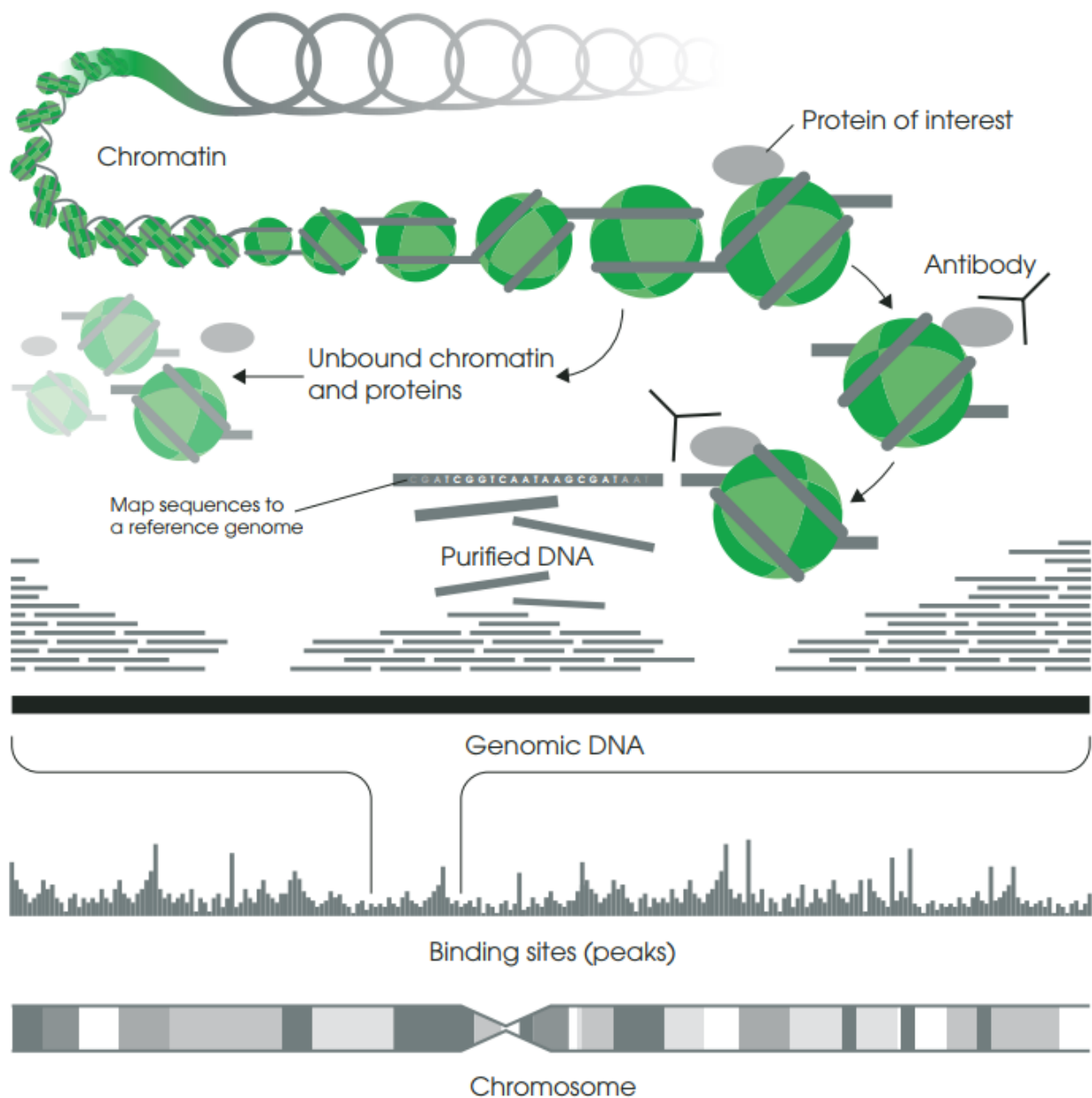


图 8: ChIP seq 概述。进行 ChIP 后，将沉淀的 DNA 用于文库制备、测序，然后将获得的序列定位到参考基因组上，接着再进行峰检测，以确定目的蛋白的结合位点。

数据分析

应针对起始材料的量不断进行数据标准化，以消除样本量不均匀引起的误差。若要标准化数据，取最终扩增子值，并将其除以 Input 的扩增子值。对于组蛋白修饰，除了 Input 量可以来标准化，相应组蛋白免疫沉淀量也可以作为标准化参照。例如，通过 H3K4me3 抗体进行的 ChIP 可以用 Input 量和组蛋白 H3 免疫沉淀量标准化。

测量起始材料的数量（和质量）是有效解释结果的关键。

使用在线软件进行 ChIP-seq 数据分析的教程

虽然 ChIP-seq 数据分析可能很复杂，但它可能是实验中最重要的一部分。稳健的数据分析是获得准确、可靠结果的关键。在线工具为生物信息学专家和实验室生物学家提供了分析数据的机会。

本分步指南说明了如何从 ChIP-seq 数据中提取可靠的结果，以及如何解读数据集，从而成功进行 ChIP-seq 分析 (Hurtado *et al.*, 2010 and Yan *et al.*, 2013)。如欲了解更多信息，请登录 www.abcam.com/ChIPanalysis 查看 Abcam 的数据分析网络研讨会。

本次网络研讨会涵盖了 ChIP 数据分析的以下步骤：

1. 测序读段 QC (FastQC)
2. 读段比对/匹配 (Galaxy/bowtie)
3. 峰检测 (Galaxy/macs)
4. 结合信号可视化 (UCSC genome browser)
5. De novo 基序查找 (MEME-ChIP)
6. 结合位点的基因本体分析 (GREAT)
7. 结合信号的热图生成 (seqMINER)

参考文献

- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*.18;129(4):823-37(2007)
- Bolduc, N. Preparation of low-input and ligation-free libraries using template-switching technology. In *Current protocols in molecular biology* (Vol. Unit 7.26).Wiley & Sons.(2016).
- Cejas, P. Chromatin Immunoprecipitation from fixed clinical tissues reveals tumor-specific enhancer profiles. *Nature Medicine*.22, 685.(2016).
- Dirks, R. Genome-wide epigenomic profiling for biomarker discovery. *Clinical Epigenetics*.8, 122.(2016) 。 ENCODE.(n.d.).ENCODE Platform Comparison. Retrieved from https://genome.ucsc.edu/ENCODE/platform_characterization.html
- Gilfillian, G. Limitations and possibilities of low cell number CHIP-SEQ. *BMC Genomics*.13, 645. (2012).
- Hurtado A, Holmes KA, Ross-Innes CS, Schmidt D, Carroll JS. FOXA1 is a key determinant of estrogen receptor function and endocrine response.*Nat Genet*.2010;43(1):27-33.
- Kidder, B. CHIP-Seq: Technical considerations for obtaining high quality data. *Nature Immunology*.12, 918.(2011).
- Mao. Accounting for immunoprecipitation inefficiencies in the statistical analysis of ChIP-Seq data. *BMC Bioinformatics*.14, 169 (2013).
- Neill O. P. L, Turner M. B. Immunoprecipitation of native chromatin: NChIP. *Methods*. Sep; 31(1):76-82 (2003)
- Reverberi, R. Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood transfusion*.5, 227.(2007).
- Schmidl, C. ChIPmentation: fast, robust, low-input ChIP-Seq for histones and transcription factors. *Nature Methods*.12, 963.(2015)。
- Stelloo, S. Androgen receptor profiling predicts prostate cancer outcome. *EMBO Mol Med*. 7, 1450. (2015)。
- Xiong, X.A scalable epitope tagging approach for high throughput ChIP-Seq analysis. *ACS Synth Biol*.(2017, Feb 19).
- Yan J, Enge M, Whittington T, Dave K, Liu J, Sur I, Schmierer B, Jolma A, Kivioja T, Taipale M, Taipale J. Transcription factor binding in human cells occurs in dense clusters formed around cohesion anchor sites. *Cell*. 2013; 154(4):801-13.

DNA 甲基化和去甲基化

DNA 化学修饰为 DNA 序列编码基因的表达增加了一层调控机制。这些化学修饰中，研究得最透彻的是 5-甲基胞嘧啶 (5mC)，该修饰被通常认为是基因表达的一种稳定的抑制性调控因子。人类基因组含有大约 1% 的甲基化胞嘧啶，因此其是最丰富、最广泛的 DNA 修饰 (Moore *et al* 2012)。有几种对整个基因组中 5mC 进行测序的方法，这些方法各有利弊，我们稍后将在本指南中进行讨论。这些方法包括全基因组亚硫酸氢盐测序、抗体依赖性 DNA 免疫沉淀 (DIP) 或 MeDIP 等高分辨率方法。

5mC 最初被发现位于 CpG 岛内，CpG 岛是富含 CpG 二核苷酸的基因启动子区域常见的一段 DNA 片段。在这些启动子区域内，5mC 充当了一种抑制基因转录的稳定的表观遗传标记的角色。在哺乳动物基因组内，甲基化胞嘧啶最初在早期发育过程中通过从头甲基转移酶 DNMT3a 和 DNMT3b 被整合到 DNA 中 (Okano *et al* 1999)。随后，一种额外的甲基转移酶 DNMT1 在 DNA 复制过程中复制 DNA 甲基化模式到子链，从而将这些甲基化标记维持在整个基因组中 (Vertino *et al* 1996)。

目前，将 5mC 视作一个完全稳定的 DNA 修饰这一想法尚不实际。整个基因组中的许多甲基化胞嘧啶，特别是基因体内的甲基化胞嘧啶，都会经历一个被称作 DNA 去甲基化的过程 - 这一过程最终会去除 5mC，将甲基化胞嘧啶转化为未修饰的胞嘧啶 (C)。DNA 去甲基化能够通过以下两种方式中的任一种方式发生：DNA 被动去甲基化：由于缺少甲基化维持酶，甲基化的胞嘧啶在基因组中被稀释掉。或 DNA 主动去甲基化：5mC 被 10-11 易位 (TET) 酶氧化为 5mC 的氧化衍生物 (参见 Wu *et al* 2017)。

DNA 主动去甲基化呈周期性，从 5mC 开始，以未修饰的 C 结束。5mC 首先被氧化为 5-羟基甲基胞嘧啶 (5hmC)，再进一步被氧化为 5-甲酰基胞嘧啶 (5fC)，后者最后再一次被氧化为 5-羧基胞嘧啶 (5caC)。接下来，胸腺嘧啶 DNA 糖基化酶 (TDG) 与碱基切除修复 (BER) 共同将 5fC 和 5caC 从 DNA 中去除，产生一个未修饰的 C (图 8)。5hmC、5fC 和 5caC 已是许多近期表观遗传学研究的焦点。关于这些表观遗传标记的发现越来越多，包括其可能具有稳定的表观遗传作用。人们已经开发了許多测序方法来区分整个基因组中的这些标记，包括利用 5hmC、5fC 和 5caC 抗体进行的 MeDIP 看到的差异，以及利用亚硫酸氢盐测序看到的差异，如 TET 辅助亚硫酸氢盐测序 (TAB-seq)。这些方法之间的差异稍后将在本指南中进行讨论。

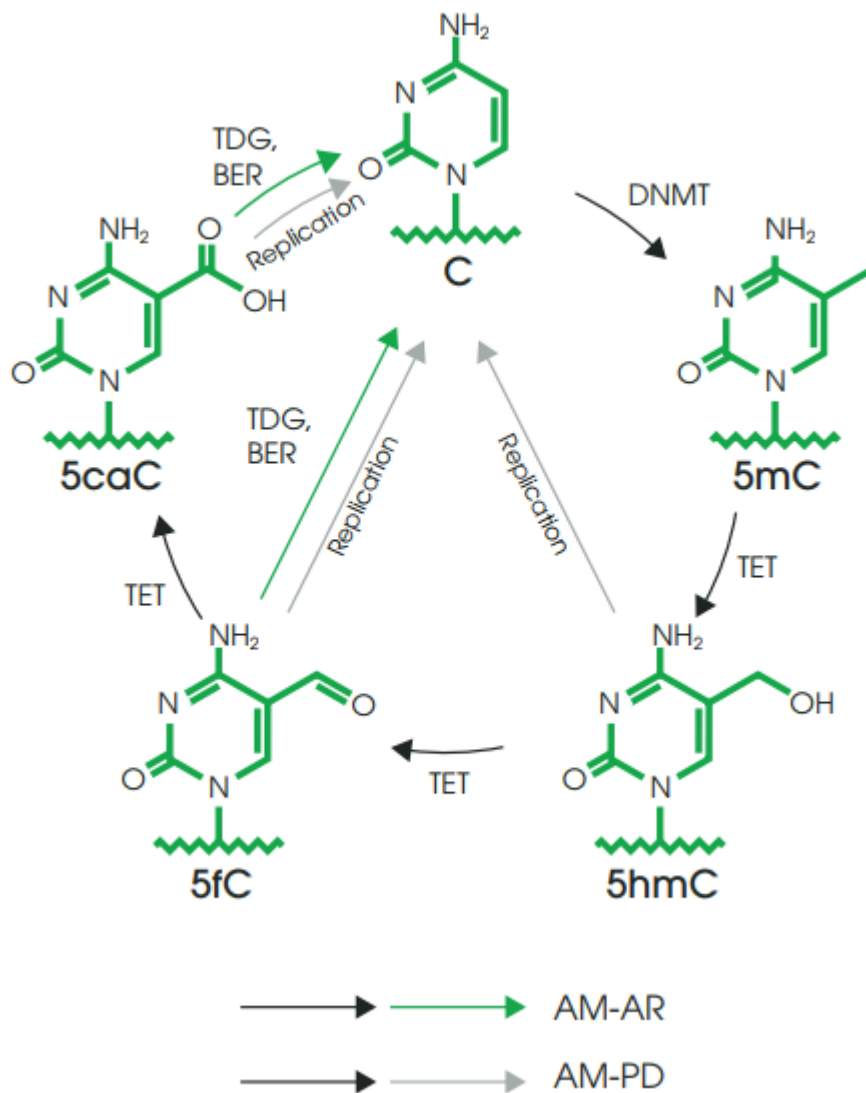


图 9. DNA 去甲基化循环。胸腺嘧啶 DNA 糖基化酶 (TDG) 与碱基切除修复 (BER) 或 5hmC、5fC 或 5caC 的复制依赖性稀释共同作用, 引发 DNA 主动去甲基化。主动修饰 - 被动稀释 (AM-PD)。主动修饰 - 主动去除 (AM-AR)。

亚硫酸氢盐测序

使用传统的 DNA 扩增方法检测 5mC 是不可能的, 因为 5mC 标记在样本制备和 DNA 扩增过程中不能维持。亚硫酸氢盐转化是将 DNA 甲基化标记转化为适合扩增和下游分析的模板所使用的最广泛的方法之一。亚硫酸氢盐转化是利用 NaOH 和亚硫酸氢钠对 DNA 进行处理的化学反应, 在该化学反应过程中, 胞嘧啶碱基被转化为尿嘧啶 (U), 而甲基化的胞嘧啶则不会被转化 (图 9)。

在 PCR 或测序等下游分析过程中, 在亚硫酸氢盐反应中发生脱氨基反应的非甲基化 C 碱基将被检出为胸腺嘧啶 (T), 而 5-mC 碱基将保持不变, 仍被测序检出为 C。这样即可确定在基因组中含有甲基化胞嘧啶的位置 (Frommer et al.,1992)

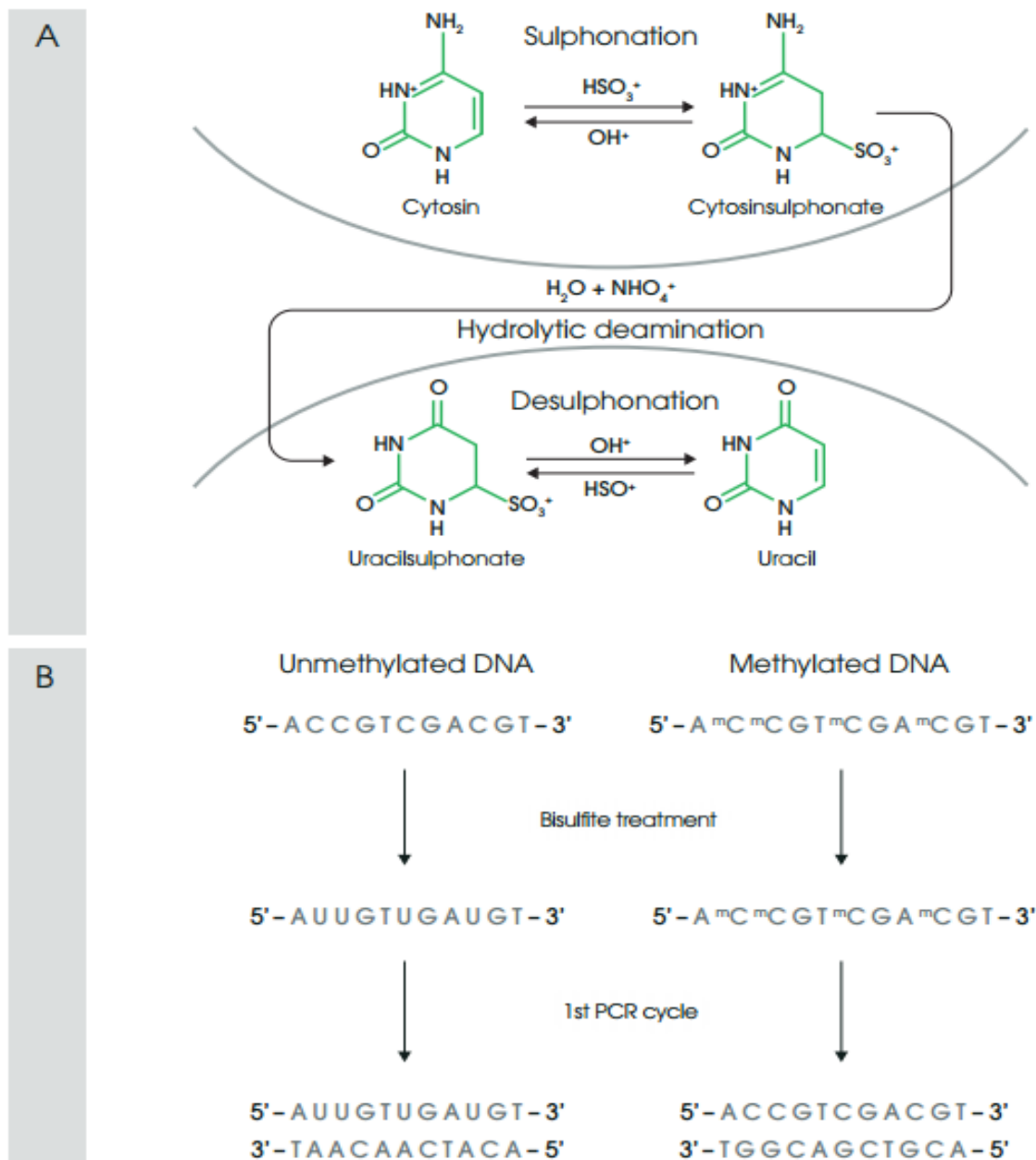


图 10. 亚硫酸氢盐转化。用亚硫酸氢盐（磺化）处理 DNA 使胞嘧啶残基发生脱氨基反应，并被转化为尿嘧啶，(A) 但 5-甲基胞嘧啶残基保持不变 (B)

基于亚硫酸氢盐的应用

亚硫酸氢盐转化已经成为为高通量应用或更广泛的全基因组范围的研究而设计的几种变体和应用的基础。

下面是基于亚硫酸氢盐的方法的一些示例。

全基因组 DNA 甲基化分析

全基因组亚硫酸氢盐测序 (WGBS; Lister *et al* 2009)

- 将新一代测序 (NGS) 技术应用于亚硫酸氢盐转化后的输入样本。
- WGBS 产生单碱基分辨率的 DNA 甲基化图谱，涵盖生物体的整个基因组。

简化代表性亚硫酸氢盐测序 (RRBS; Meissner *et al.*, 2005)

- 将亚硫酸氢盐的单碱基分辨率、高通量测序的基因组范围以及甲基化敏感性限制性内切酶的使用进行结合，用来富集高 CpG 含量的样本。
- 将测序有效限定在存在 DNA 甲基化的目标区域。

靶向 DNA 甲基化分析

甲基化特异性 PCR (MS-PCR; Herman *et al.*, 1996)

- 采用特异的 PCR 引物识别经亚硫酸氢盐转化后的甲基化抑或是未甲基化 DNA 模板。差异化的 PCR 扩增可以显示 DNA 甲基化修饰是否存在。

焦磷酸测序 (Colella *et al.*, 2003; Tost *et al.*, 2007)

- 也称为合成测序法，可在特定目标区域检测经亚硫酸氢盐转化后的 DNA。5mC 的水平通过比较单个基因座上 C 和 T 碱基的比例确定。

高分辨率溶解曲线 (HRM) 分析 (Wojdacz and Dobrovic, 2007)

- 最初应用于 SNP 检测，现在还用于 DNA 甲基化。基于 real-time PCR 的实验方案可以测量 PCR 扩增产物的溶解温度。C-T 含量不同导致的溶解温度变化与样本中 DNA 甲基化的水平相对应。

甲基化敏感的单核苷酸引物延伸 (MS-SnuPE; Gonzalgo and Jones PA, 1997)

- 通过将亚硫酸氢盐特异性引物靶向在 CpG 之前的序列来查询目的 CpG。DNA 聚合酶终止双脱氧核苷酸允许引物延伸单个碱基，然后定量测定其 C-T 含量，确定其 DNA 甲基化状态。

亚硫酸氢盐转化：技术考量

不完全转化

亚硫酸氢盐转化是一种非常有效的方法，其操作相对简单，并可以提供 DNA 甲基化状态的单碱基分辨率。但是，这种方法确实存在一些缺点：在次优反应条件（导致 DNA 变性不足）下，或反应完成前 DNA 链重新退火时，可发生不完全转化（偶尔还会发生过度转化）。

区分 5hmC

DNA 降解通常是由剧烈的亚硫酸氢盐转化反应条件导致，因而少量样本的处理难度会增大。反应过程中，去磺化不充分会残留可抑制 PCR 中使用的 DNA 聚合酶活性的物质。最新证据表明，5mC 和 5hmC 亚硫酸氢盐转化不作区分，因此降低了 DNA 序列的总体复杂性。降低序列复杂性会增加 PCR 下游询问引物设计的复杂程度，或者增加将测序读段唯一地定位到参考基因组的难度。

DNA 免疫沉淀 (DIP)

另一种常用于绘制 DNA 甲基化标记位置的方法是 DIP。DIP 在很大程度上依赖于拥有能够识别目标 DNA 修饰的抗体。但是，如果您拥有这种抗体，DIP 将会是一种直接有效的方法。与需要进行全基因组测序的 WGBS 测序相比，这一技术价格更低，而且更易分析。DIP 只需要对免疫沉淀步骤中拉下的被剪切的小 DNA 区域进行测序。

DIP 已经成功应用于已表征最充分的 DNA 修饰：5mC、5hmC、5fC 和 5caC (Pastor *et al.*, 2011, Shen *et al.*, 2013)。而且还被用于一系列样本，包括胚胎干细胞 (ES)、脑组织和斑马鱼胚胎。该方法类似于 ChIP，但您的起始物料是不需要染色质的原始基因组 DNA。这种基因组 DNA 会被剪切到约 150-300 bp 大小，剪切后的 DNA 可以发生热变性。该步骤至关重要，因为抗体仅能够识别变性（开放）的 DNA 内的修饰。

DNA 变性后，剪切的 DNA 与识别靶标修饰的抗体一起孵育，通常孵育过夜，然后样本通过 IP 步骤拉下与抗体结合的所有 DNA，并洗去任何未结合的 DNA。我们建议使用磁珠进行该 IP 步骤。当您进行 DIP 时，要点是用 RNase 处理您的初始基因组 DNA，从而去除样本中的任何 RNA。

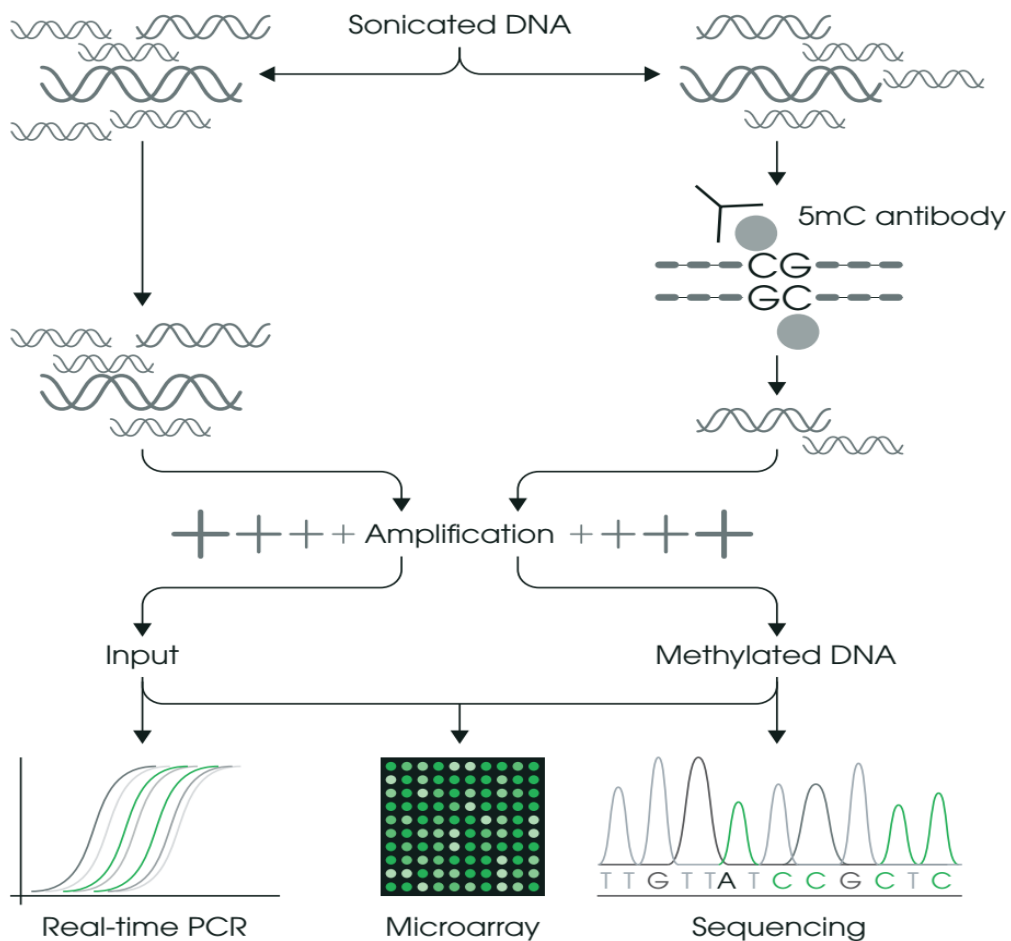


图 11. DIP 方法学。剪切基因组 DNA，使用靶向 DNA 修饰的抗体进行免疫沉淀。然后将拉下的 DNA 和 input 样本用于 qPCR、微阵列或 NGS。

基于 DIP 的应用

全基因组 DIP 分析

DIP-测序 (Pastor *et al.*, 2011)

- DIP 与 NGS 结合，绘制整个基因组的 DNA 修饰位置。
- 由于不同物种之间这些化学结构的保守性，所以研究人员很容易在任何物种中对其选择的那种 DNA 修饰进行测序。
- DIP-测序的文库制备和分析与 ChIP-Seq 非常相似。
- 利用 IP 拉下小 DNA 片段来制备文库；与 WGBS 相比，这些片段可以在相对较低的读取深度进行测序，因为您对测序序列的选择性更大，也就是说只对与您的抗体结合的区域进行测序。

靶标 DIP 分析：

DIP-PCR (Pastor *et al.*, 2011)

- 通过 IP 中，您获得了拉下的 DNA，如上文 DIP-测序部分所述。但是，这次不需要使用剪切后的 DNA 进行文库制备，您可以在 qPCR 中将其作为模板 DNA。
- 为该类型的 DNA 设计引物时，必须考虑到作为基因组 DNA 的模板会同时包含外显子和内含子。该方法可以非常有效地确定样本间的修饰水平。
- 由于修饰水平的检测受抗体亲和力等诸多因素影响，因此不同修饰之间水平的比较会很棘手。

DIP：技术考量

适当剪切您的样本。

与 WGBS 不同，DIP 不是单碱基分辨率。剪切 DNA 样本时，要点是 DNA 片段大小为 150-300 bp，以提高 DIP 测序的分辨率。大片段意味着您不可避免地会拉下在您的目标 DNA 修饰前后更多的 DNA 序列，抗体与这些 DNA 序列不会物理结合。这会导致您的测序分析中出现宽的非特异性峰。

寻找高效抗体。

特异的靶标修饰抗体对 DIP 来说至关重要。确保抗体与类似的修饰（例如 5fC 和 5hmC）的交叉反应性最低。使用抗体进行此类测序的优势在于，您仅受是否有可用抗体的限制。如果您想研究之前未在 DNA 中表征过的修饰，例如 m6A（通常与 RNA 相关），只要您有特异的 m6A 抗体，就可以作此研究。

捕获 5hmC、5fC 和 5caC 的替代方法

传统亚硫酸氢盐测序最大的缺点是无法区分 5mC 的氧化衍生物，只能描绘 5mC 本身。幸运的是，亚硫酸氢盐测序的变体有很多，此外，还有一些全新的方法可以解决 5hmC、5fC 和 5caC 的测序问题。下面我们来详细地讨论其中的一些新方法。

5hmC 定位

Tet 辅助亚硫酸氢盐测序法 (TAB-seq; Yu *et al.*, 2012)

- 该方法依赖于 5hmC 到 5gmC 的转化。在该糖基化反应中加入葡萄糖可保护 5hmC。
- 然后向基因组 DNA 中加入 TET 酶，将存在的所有 5mC 和 5fC 转化为 5caC。亚硫酸氢盐转化后，5hmC 读取为 C。
- 5caC 和非甲基化的胞嘧啶均读取为 T。该方法可明确区分 5mC 和 5hmC。
- 该方法的问题在于，所有到 T 的转化都会让产生的末端序列的定位增加难度。此外，它还需要非常深入的测序才能获得基因组的全覆盖，因此相较其他方法而言，这种方法成本更高。

氧化亚硫酸氢盐测序法 (oxBS-seq; Booth *et al.*, 2012)

- 这是另一种在单碱基分辨率的尺度下检测 5hmC，并使用高钌酸钾 (KRuO₄) 以化学方式将 5hmC 转化为 5fC 的方法。
- 转化后，所有 5mC 保持不变。随后通过亚硫酸氢盐处理和测序，您可以比较经 KRuO₄ 处理和未经 KRuO₄ 处理的样本来区分 5mC 和 5hmC 位点。

hMe-Seal. (Song *et al.*, 2011)

- 与 TAB-seq 类似，hMe-Seal 首先进行 5hmC 到 5gmC 的糖基化，但添加的葡萄糖分子被改造而含有一个可被生物素化学修饰的叠氮基团。
- 然后，利用生物素和链霉亲和素之间的紧密结合拉下 5hmC，从而在基因组范围内富集 5hmC。

用核酸外切酶进行选择化学标记 (SCL-exo; Sérandour *et al.*, 2016)

- 与 hMe-Seal 相同，该方法的初始步骤也是 5hmC 的叠氮-葡萄糖糖基化。
- 与生物素的叠氮化物反应使存在的 5hmC 与链霉亲和素连接，但是，在该方法中，捕获的 DNA 将经受核酸外切酶消化过程，而这一过程将在生物素-5gmC 处停止。

5fC/5caC 定位

M.SssI 甲基化酶辅助亚硫酸氢盐测序法 (MAB-seq; Wu *et al.*, 2014)

- 该方法可以在单碱基分辨率下定量测定 5fC 和 5caC。这是通过利用在您 DNA 上 M.SssI 甲基转移酶将所有未修饰的胞嘧啶转化为 5mC 来实现。
- 亚硫酸氢盐处理完成后，所有新修饰的 C、5mC 和 5hmC 将在测序中读取为 C，但基因组中所有的 5fC 和 5caC 将读取为 T。
- 将这一结果与未经 M.SssI 处理的测序结果进行比较，即可确定 5fC 和 5caC 修饰在基因组中的位置。
- 这种方法的最大问题在于不能区分 5fC 和 5caC。

5fC 化学辅助亚硫酸氢盐测序法 (fCAB-seq; Song *et al.*, 2013)

- 该技术依赖于使用 O-乙基羟胺 (EtONH₂) 对 5fC 进行的化学保护。
- 这种保护阻断了亚硫酸氢盐介导的 5fC 的脱氨，因此在测序结果中以 C 的形式出现(与 5mC 和 5hmC 相同)。
- 将这一结果与未用 EtONH₂ 处理的样本(其中所有 5fC 修饰将读取为 T)进行比较，即可区分基因组中存在 5fC 的所有位点。

5caC 化学辅助亚硫酸氢盐测序法 (caCAB-seq; Lu *et al.*, 2013)

- caCAB-seq 利用 1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基] 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 对基因组内的 5caC 进行修饰，促使酰胺键结合至 5caC。
- 这种化学修饰可阻断 5caC 在经亚硫酸氢盐转化后发生的脱氨基反应，因而在测序时可将 5caC 与 5fC 区分开来。

化学标记促成的 C-T 转化测序法 (CLEVER-seq; Zhu *et al.*, 2017)

- CLEVER-seq 不仅是单碱基分辨率，还可以在单细胞上使用。此方法只能对 5fC 分布进行测序，但不能用于 5caC 分布的测序。
- 该方法使用丙二腈选择性地标记 5fC，生成 5fC-M 加合物，在测序中读取为 T。

DNA 修饰测序方法的比较

选择适合您需要的最佳 DNA 修饰检测方法很重要。如需量化修饰的绝对水平，您需要考虑是否需要单碱基分辨率，以及在您的模型系统或样本类型中使用该方法的可行性。下表汇总了一些可用的 5hmC、5fC 和 5caC 测序方法的重要特点。

表 6: DNA 修饰测序法

仅适用于 5hmC 定位

名称	说明	单碱基分辨率?	可对修饰进行绝对定量?	参考文献
5hmC-DIP	用 5hmC 特异性抗体富集 5hmC。	否	否	Pastor, W. A. <i>et al</i> Nature 2011
TAB-seq	5hmC 转化为 5gmC, 对其进行保护。5mC 通过 TET 酶转化为 5caC。亚硫酸氢盐转化后, 5hmC 读取为 C。5mC 和 5caC 读取为 T。	是	是	Yu, M. <i>et al</i> Cell, 2012
oxBS-seq	使用 K ₂ Cr ₂ O ₇ 以化学方式将 5hmC 转化为 5fC, 可在单碱基分辨率下区分 5mC 和 5hmC。	是	是	Booth, M. J. <i>et al</i> Science, 2012
hMe-Seal	5hmC 与叠氮-葡萄糖分子和生物素发生糖基化, 利用生物素/链霉亲和素结合作用拉下富集 5hmC。	否	否	Song, C. X. <i>et al</i> . Nature Biotechnology 2011
SCL-exo	5hmC 的叠氮-葡萄糖糖基化及后续生物素反应, 而核酸内切酶活性在生物素-5gmC 处停止。	是	否	Sérandour, A. A. <i>et al</i> . Genome Biology 2016

5fC 和 5caC 定位

名称	说明	单碱基分辨率?	可对修饰进行绝对定量?	参考文献
5fC/5caC DIP	使用 5fC 和 5caC 特异性抗体富集这些标记。	否	否	Shen, L. <i>et al</i> . Cell 2013
MAB-seq	M.SssI 处理 DNA, 将所有 C 转化为 5mC。然后, 亚硫酸氢盐转化导致所有 C、5mC 和 5hmC 读取为 C。所有 5fC 和 5caC 读取为 T。	是	是	Wu, H., Nature Biotechnology 2014
fCAB-seq	EtONH ₂ 保护基因组中的所有 5fC 在亚硫酸氢盐处理后不被氧化。	是	是	Song, X. <i>et al</i> . Cell 2013
caCAB-seq	EDC 用于催化 5caC 形成酰胺键, 阻断 5caC 在亚硫酸氢盐转化时脱氨。	是	是	Lu, X. <i>et al</i> . JACS 2013
CLEVER-seq	丙二腈选择性标记 5fC, 生成 5fC-M 加合物, 在测序中被读取为 T。	是	是	Zhu, C. <i>et al</i> . Cell Stem Cell 2017

液相色谱串联质谱法 (LC/MS-MS)

如果您可以在实验室使用 LC-MS/MS，那么 LC-MS/MS 是对总基因组 DNA 中 DNA 修饰水平定量的最佳方法 (Le *et al* 2011 和 Fernandez *et al.*, 2018)。使用绝对定量法，LC-MS/MS 可对任何物种和细胞类型的总 DNA 中已发现的所有 DNA 修饰进行平行定量 (Zhang *et al* 2012)。使用绝对定量法，您仅受采用何种作样本检测标准品用的同位素标准品的限制。

使用该技术并结合 DIP (DIP-MS)，您可以确定靶向 DNA 修饰的抗体是否与您的目标修饰进行了结合，而且可以查看其是否结合了任何其他非特异性修饰。如果您生成了 DIP input 和拉下样本的 LC-MS/MS 数据，您应该可以看到，与 input 相比，您的目标修饰在拉下的样本中有所富集。您还可以使用这些相同的数据检测其他修饰，来看您的样本中是否有其他成分也富集了，以判读是否有非特异的抗体结合。目前正在开发的软件可以帮助您进行这种类型的分析。

LC/MS-MS: 技术考量

技术挑战

MS 设备非常昂贵，而且专业性非常强。机器本身需要大量的维护，并且往往要求其自身的技术人员掌握一切运行情况。机器操作非常复杂，需要专门的培训，因此您自己可能很难获得这种类型的 MS 数据。如果您无法购买自己拥有的 LC/MS-MS 设备，可以考虑通过合作或有偿服务获得这些数据。

DNA 修饰 IHC/ICC

也可以做 IHC/ICC 来检测 DNA 修饰。在标准 IHC/ICC 实验方案的基础上添加一些简单的步骤，即可完成对 DNA 修饰的检测。您需要考虑的最显著的差异是，如果修饰位于双链 DNA 内，那么靶向 DNA 修饰的抗体不能进入双链 DNA 内而不能结合该修饰。这意味着您需要使 DNA 变性，让其成为单链 DNA 而被抗体结合。

最常用的 DNA 变性方法是用酸处理您的样本。通常是将 4N 盐酸 (HCL) 直接加到 IHC/ICC 切片上 (Yamaguchi *et al.*, 2013 和 Kaefer *et al.*, 2016)。在加入一抗之前添加此步骤是最好的。使用洗涤剂 (例如 PBS 0.1% Triton) 对细胞或组织进行通透处理后，可清洗并加入 4N HCl 使 DNA 链变性。上述步骤完成后，要点是彻底洗掉酸，并用碱 (例如，100 μ M NaOH 的 PBS 溶液) 对酸进行中和。洗掉并中和掉酸以后，您可以继续常规的 IHC/ICC 步骤并加入一抗。

在对 DNA 修饰进行 IHC/ICC 检测时，您还应该警惕您的抗体可能识别 RNA 上高度相似的其他修饰 (例如 DNA 上的 5mC 和 RNA 上的 m5C)。为避免此问题，您可以通过 RNase 步骤处理您的样本，以去除存在的所有 RNA。同样，应优化此步骤，因为您的样本经 RNase 处理的时间过长也会对存在的 DNA 造成损伤。

DNA 修饰 IHC/ICC: 技术考量

计算酸处理步骤所用的时间。

- 开始使用实验样本做实验之前，优化酸处理步骤的酸浓度和处理时间至关重要。
- 酸处理时间过长会破坏样本，但仍需要足够长的时间进行酸处理，以使 DNA 完全变性。
- 相较于 ICC 的细胞而言，组织样本的酸处理时间需要更长。您应该尝试从 10 分钟到 40 分钟不等的处理时间，并查看处理后的信号情况。
- ICC 最多只需要 5 至 10 分钟酸处理时间，但首先进行测试并正确地优化实验条件很重要。

双重 IHC/ICC。

- 考虑到酸处理步骤的影响，做双重 IHC/ICC 检测 DNA 修饰会比较困难。酸处理可能会使样本中存在的蛋白质变性或降解您的第二个一抗识别的抗原表位。
- 如果您想进行该等双重免疫检测，则需要仔细优化实验条件。尽量减少样本酸处理时间，以减少酸处理对其它蛋白质的损害。您还可以考虑依次进行两个一抗的孵育步骤。
- 例如，孵育完第一个一抗后，在酸处理步骤和加入第二个一抗（例如 DNA 修饰抗体）之前，用甲醛类固定剂对第一个一抗进行固定。

选择合适的 DNA 染色剂。

- 您可能会发现，由于酸处理步骤，您无法使用标准的 DNA 染色剂。例如，DAPI 可能不能很好地与酸处理后的 DNA 结合，因为它识别的是双链 DNA 中的腺嘌呤-胸腺嘧啶碱基。
- 碘化丙啶 (PI) 是多数实验室中常见的好的替代 DNA 染色剂。PI 可以识别双链和单链核苷酸链。
- 这意味着它也会识别样本中的所有 RNA，因此请注意这一点。除此以外，您还可以找到许多可识别单链 DNA 的市售 DNA 染色剂。

甲基结合域蛋白 (MBDs)

5mC 及其氧化衍生物在基因沉默和在 DNA 去甲基化后促进基因表达方面起着重要作用。现在已经知道，其中一些 DNA 修饰可以作为标记，将蛋白质招募到特定的 DNA 位点，改变基因表达，充当表观遗传标记。除 5mC 外，MBD3 和甲基 CpG 结合蛋白 2 (MECP2) 还能结合 5hmC。一旦与 5hmC 结合，它们就会在 DNA 可及性和转录激活中发挥作用 (Yildirim *et al.*, 2011 和 Mellén *et al.*, 2012)。

筛选 DNA 修饰结合物的常用方法是先使用下拉技术，然后通过 MS 筛选任何被拉下的蛋白质。该方法已成功用于发现 5mC、5hmC 和 5fC 的结合物 (Iurlaro *et al.*, 2013 和 Sprujit *et al.*, 2013)。在此实验中，您需要创建一个包含目标修饰的合成的诱饵 DNA、包含其他修饰的诱饵以及未修饰的胞嘧啶，作为对照。这种诱饵 DNA 的一端应与生物素分子相连，后者可用于将诱饵结合在连有链霉亲和素的磁珠上。然后将您目的样本中的蛋白提取物添加到被栓系的诱饵上，并通过各种洗涤步骤冲洗掉任何非特异性结合的蛋白。之后，您可以洗脱剩余的蛋白质并进行 MS 分析，来找出您的特定结合物。

MBDs: 技术考量

DNA 序列

- 设计合成 DNA 序列时，您可能需要考虑序列本身可能会影响您下拉哪些结合物。
- 您脑海中可能有一个想用作诱饵的序列，比如目标基因的启动子区域。
- 实验中使用多种序列有助于确保是修饰作为关键因素，而非 DNA 序列。

修饰次数

- 您序列中的 DNA 修饰次数也可能影响与您的诱饵结合的蛋白质。
- 您应该考虑在一个序列中只进行一次修饰或多次修饰，以了解修饰次数对结果的影响。

洗涤

- 如果您想确保与您的诱饵结合的蛋白质是修饰的真正结合物，严谨的洗涤很重要。
- 您可以尝试使用高盐洗涤来确保您可以去除所有非特异性结合的蛋白，但是这种方法存在去除所有蛋白的风险，因此您需要优化此步骤，以获得最佳结果。

新型 DNA 修饰

新型 DNA 修饰很可能存在，只是还没有被发现。现已证实，习惯上被视为 RNA 修饰的一些修饰也可能存在于 DNA 内。举个恰当的例子，N6-腺嘌呤甲基化，即 RNA 中的 m6A 和 DNA 中的 6mA。这种修饰是最著名且最丰富的 RNA 修饰之一，但现在已经知晓它也存在于 DNA 内。发现这一现象的首批研究之一是 John Gurdon 的实验室在 2016 年进行的一项研究 (Koziol *et al.*, 2016)。他们利用靶向 6mA 的抗体进行 DIP-seq 后发现，非洲爪蟾、小鼠和人类基因组中存在 6mA。

继该项研究之后，有多项研究表明斑马鱼和猪基因组 (Liu *et al.*, 2016)、经受环境压力后的小鼠大脑 (Yao *et al.*, 2017) 以及拟南芥基因组 (Liang *et al.*, 2018) 内存在 6mA。2018 年的一项研究进一步发现了分别负责 6mA 甲基化和去甲基化的酶，N6AMT1 和 ALKBH1 (Xiao *et al.*, 2018)。存在主动添加和删除 DNA 修饰的酶表明，这些酶的存在确实有一定的目的，并且可能有自身的表观遗传学功能。

新型 DNA 修饰: 技术考量

抗体可用性

- 在单碱基分辨率方法应用于检测单个修饰之前，许多研究在很大程度上都靠使用基于抗体的下拉 (DIP-seq) 来寻找 DNA 内的新型修饰。
- 这里最大的问题是，您需要依赖一种特异性的市售抗体来检测修饰，而情况通常并非如此。许多检测 RNA 修饰抗体也会识别 DNA 内的修饰，因此这也是您可以采取的一种方法。
- 用 RNase 处理您的样本将有助于确保您的抗体只靶向 DNA。登录 www.abcam.com/rnamods 查看 Abcam 提供的检测 RNA 修饰的抗体。

DNA 甲基化和去甲基化参考文献

- Booth, M.J., Branco, M.R., Ficz, G., Oxley, D., Krueger, F., Reik, W., & Balasubramanian, S. (2012). Quantitative sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution. *Science*, 336(6083), 934-937.
- Booth, M. J., Ost, T. W. B., Beraldi, D., Bell, N. M., & Branco, M. R. (2014). Europe PMC Funders Group Oxidative bisulfite sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine, 8(10), 1841-1851.
- Colella, S., Shen, L., Baggerly, K. A., Issa, J. P. J., & Krahe, R. (2003). Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing™ methylation analysis of CpG sites. *BioTechniques*, 35(1), 146-150.
- Fernandez, A. F., Valledor, L., Vallejo, F., Cañal, M. J., & Fraga, M. F. (2018). Quantification of Global DNA Methylation Levels by Mass Spectrometry. In J. Tost (Ed.), *DNA Methylation Protocols* (pp. 49-58). New York, NY: Springer New York.
- ML., G., & PA., J. (1997). Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Nucleic Acids Research*, 25(12 PG-2529-31), 2529-2531.
- Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D., & Baylin, S. B. (1996). Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands (DNA methylation/tumor suppressor genes/p16/p15). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(September), 9821-9826.
- Kafer, G. R., Li, X., Horii, T., Suetake, I., Tajima, S., Hatada, I., & Carlton, P. M. (2016). 5-Hydroxymethylcytosine Marks Sites of DNA Damage and Promotes Genome Stability. *Cell Reports*, 14(6), 1283-1292.
- Koziol, M. J., Bradshaw, C. R., Allen, G. E., Costa, A. S. H., Frezza, C., & Gurdon, J. B. (2016). Identification of methylated deoxyadenosines in vertebrates reveals diversity in DNA modifications. *Nature Structural and Molecular Biology*, 23(1), 24-30.
- Le, T., Kim, K. P., Fan, G., & Faull, K. F. (2011). A sensitive mass spectrometry method for simultaneous quantification of DNA methylation and hydroxymethylation levels in biological samples. *Analytical Biochemistry*, 412(2), 203-209.
- Liang, Z., Shen, L., Cui, X., Bao, S., Geng, Y., Yu, G., ... Yu, H. (2018). DNA N6-Adenine Methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Developmental Cell*, 45(3), 406-416.e3.
- Lister, R., Pelizzola, M., Downen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-filippini, J., ... Ecker, J. R. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 462(7271), 315-322.
- Liu, J., Zhu, Y., Luo, G. Z., Wang, X., Yue, Y., Wang, X., ... He, C. (2016). Abundant DNA 6mA methylation during early embryogenesis of zebrafish and pig. *Nature Communications*, 7(866), 1-7.
- Lu, X., Song, C., Szulwach, K., Wang, Z., Weidenbacher, P., Jin, P., & He, C. (2013). Chemical Modification-Assisted Bisulfite Sequencing (CAB-Seq) for 5-Carboxylcytosine Detection in DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, 135(25), 9315-9317.
- Lurlaro, M., Ficz, G., Oxley, D., Raiber, E. A., Bachman, M., Booth, M. J., ... Reik, W. (2013). A screen for hydroxymethylcytosine and formylcytosine binding proteins suggests functions in transcription and chromatin regulation. *Genome Biology*, 14(10), 1-11.
- Meissner, A., Gnirke, A., Bell, G. W., Ramsahoye, B., Lander, E. S., & Jaenisch, R. (2005). Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Research*, 33(18), 5868-5877.
- Mellén, M., Ayata, P., Dewell, S., Kriaucionis, S., & Heintz, N. (2012). MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell*, 151(7), 1417-1430.
- Moore, L.D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1),

- 23-38.Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., & Li, E. (1999).Cell 1999 Okano, 99, 1-11.
- Pastor, W. A., Pape, U. J., Huang, Y., Henderson, H. R., Lister, R., Ko, M., ... Rao, A. (2011). Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells.Nature, 473(7347), 394-397.
- Sérandour, A. A., Avner, S., Mahé, E. A., Madigou, T., Guibert, S., Weber, M., & Salbert, G. (2016). Single-CpG resolution mapping of 5-hydroxymethylcytosine by chemical labeling and exonuclease digestion identifies evolutionarily unconserved CpGs as TET targets. Genome Biology, 17(1), 1-12.
- Shen, L., Wu, H., Diep, D., Yamaguchi, S., D'Alessio, A. C., Fung, H. L., ... Zhang, Y. (2013). Genome-wide analysis reveals TET- and TDG-dependent 5-methylcytosine oxidation dynamics. Cell, 153(3), 692-706.
- Song, C. X., Szulwach, K. E., Fu, Y., Dai, Q., Yi, C., Li, X., ... He, C. (2011). Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine.Nature Biotechnology, 29(1), 68-75.
- Song, C. X., Szulwach, K. E., Dai, Q., Fu, Y., Mao, S. Q., Lin, L., ... He, C. (2013). Genome-wide profiling of 5-formylcytosine reveals its roles in epigenetic priming.Cell, 153(3), 678-691.
- Spruijt, C. G., Gnerlich, F., Smits, A. H., Pfaffeneder, T., Jansen, P. W. T. C., Bauer, C., ... Vermeulen, M. (2013). Dynamic readers for 5-(Hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives.Cell, 152(5), 1146-1159.
- Vertino, P. M., Yen, R. W., Gao, J., & Baylin, S. B. (1996). De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5-)-methyltransferase.Molecular and Cellular Biology, 16(8), 4555-4565.
- Wu, H., Wu, X., Shen, L., & Zhang, Y. (2014). Single-base resolution analysis of active DNA demethylation using methylase-assisted bisulfite sequencing.Nature Biotechnology, 32(12), 1231-1240.
- Wu, X., & Zhang, Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation: Mechanism, function and beyond.Nature Reviews Genetics, 18(9), 517-534.
- Xiao, C. Le, Zhu, S., He, M., De Chen, D., Zhang, Q., Chen, Y., ... Yan, G. R. (2018). N6-Methyladenine DNA Modification in the Human Genome.Molecular Cell, 1-13.
- Yamaguchi, S., Hong, K., Liu, R., Inoue, A., Shen, L., Zhang, K., & Zhang, Y. (2013). Dynamics of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine during germ cell reprogramming.Cell Research, 23(3), 329-339.
- Yao, B., Cheng, Y., Wang, Z., Li, Y., Chen, L., Huang, L., ... Jin, P. (2017). DNA N6-methyladenine is dynamically regulated in the mouse brain following environmental stress.Nature Communications, 8(1), 1-10.
- Yildirim, O., Li, R., Hung, J. H., Chen, P. B., Dong, X., Ee, L. S., ... Fazio, T. G. (2011). Mbd3/NURD complex regulates expression of 5-hydroxymethylcytosine marked genes in embryonic stem cells.Cell, 147(7), 1498-1510.
- Yu, M., Hon, G. C., Szulwach, K. E., Song, C. X., Zhang, L., Kim, A., ... He, C. (2012).Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome.Cell, 149(6), 1368-1380.
- Zhang, L., Zhang, L., Zhou, K., Ye, X., Zhang, J., Xie, A., ... Cai, C. (2012).Simultaneous determination of global DNA methylation and hydroxymethylation levels by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry.Journal of Biomolecular Screening, 17(7), 877-884.
- Zhu, C., Gao, Y., Guo, H., Xia, B., Song, J., Wu, X., ... Kee, K. (2017). Single-Cell 5-Formylcytosine Landscapes of Mammalian Early Embryos and ESCs at Single-Base Resolution Single-Cell 5-Formylcytosine Landscapes of Mammalian Early Embryos and ESCs at Single-Base Resolution. Stem Cell, 1-12.

RNA 修饰

表观遗传学领域正在衍生出许多令人兴奋的新分支。其中一条分支是 RNA 修饰研究领域。RNA 修饰检测和测序方法（例如 m6A 单碱基分辨率紫外交联沉淀，miCLIP）开发方面的最新进展意味着在任意种类的细胞或模型生物中发现新的 RNA 修饰并将该修饰定位至不同种类的 RNA 上的过程变的越来越容易，也越来越快速。这项技术的进步使得已知 RNA 修饰数量激增。目前，已知的 RNA 化学修饰 (Roundtree *et al.*, 2017) 已有 100 多种。您会发现这些修饰存在于 mRNA、tRNA、rRNA 和其他非编码 RNA（包括 miRNA）上。这些修饰中，每一种修饰都有自己的功能，包括 RNA 结构、输出、稳定性和 mRNA 剪接。该研究领域的未来一片光明；但仍有许多有关部分新修饰功能的内容尚待探索。

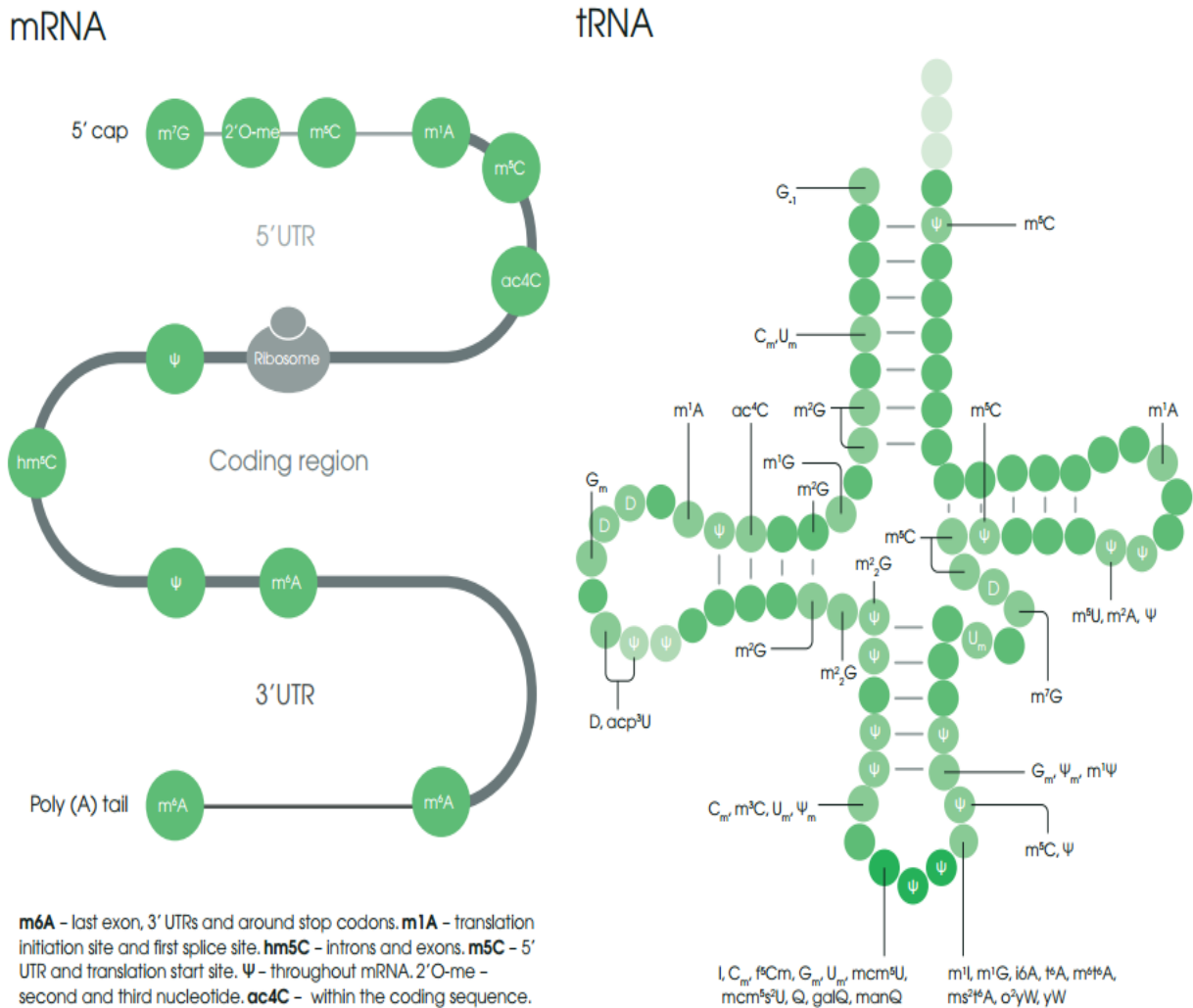


图 12. RNA 修饰在 mRNA 和 tRNA 上的分布。登录 www.abcam.com/RNAmodificationsposter 查看我们的 RNA 修饰海报，了解更多内容。

在所有的 RNA 物种中，tRNA 包含的 RNA 修饰最多。tRNA 内，约五分之一的核苷酸被认为含有 RNA 修饰 (Kirchner *et al.*, 2015)。tRNA 修饰非常多样化，需要通过多种酶逐步形成。通常情况下，您可以在 tRNA 的反密码子环中发现修饰，修饰有助于通过协助密码子-反密码子相互作用和防止移码来提高翻译效率 (Stuart *et al.*, 2003)。

RNA 修饰领域相对较新，但每天都在发展。在本节中，我们将对其中的一些方案进行介绍，并提供一些与 RNA 修饰相关的技巧和建议。

获得对您选择的 RNA 修饰具有特异性的抗体可能困难重重。我们有许多被充分引用且经充分验证的 RNA 修饰抗体，包括曾被多篇知名论文引用的 m6A 抗体，这些论文包括一篇发表在 *Nature Methods*、使用我们的 m6A 抗体进行 m6A 单碱基分辨率测序的论文 (Linder *et al.*, 2015)。同一 m6A 抗体还被一篇 *Nature* 论文引用，该论文描述了 m6A 在 mRNA 稳定性方面的作用 (Mauer *et al.*, 2017)。如需了解我们 RNA 修饰抗体的完整列表，请登录 www.abcam.com/RNAmods

RNA 免疫沉淀 (RIP)

RIP 是一种基于抗体的技术，用于绘制体内 RNA-蛋白质相互作用的图谱。目标 RNA 结合蛋白 (RBP) 与其相关 RNA 一起免疫沉淀，以识别结合的转录本 (mRNA、非编码 RNA 或病毒 RNA)。通过实时 PCR、微阵列或测序检测转录本。

除转录和后续翻译之外，RNA 的功能还有很多。例如，RNA-蛋白质相互作用能够调节 mRNA 和非编码 RNA 功能。对 RNA 潜在作用的新认识促进了新方法的开发，使得研究人员能够绘制 RNA-蛋白质相互作用的图谱。RIP 就是这样一种研究单个蛋白质和 RNA 分子之间物理关联的方案。

查看我们的完整 RIP 方案：www.abcam.com/RIP

改编自 Khalila *et al.*(2009), Hendrickson *et al.* (2009), Hendrickson *et al.* (2008) and Rinn *et al.* (2007)

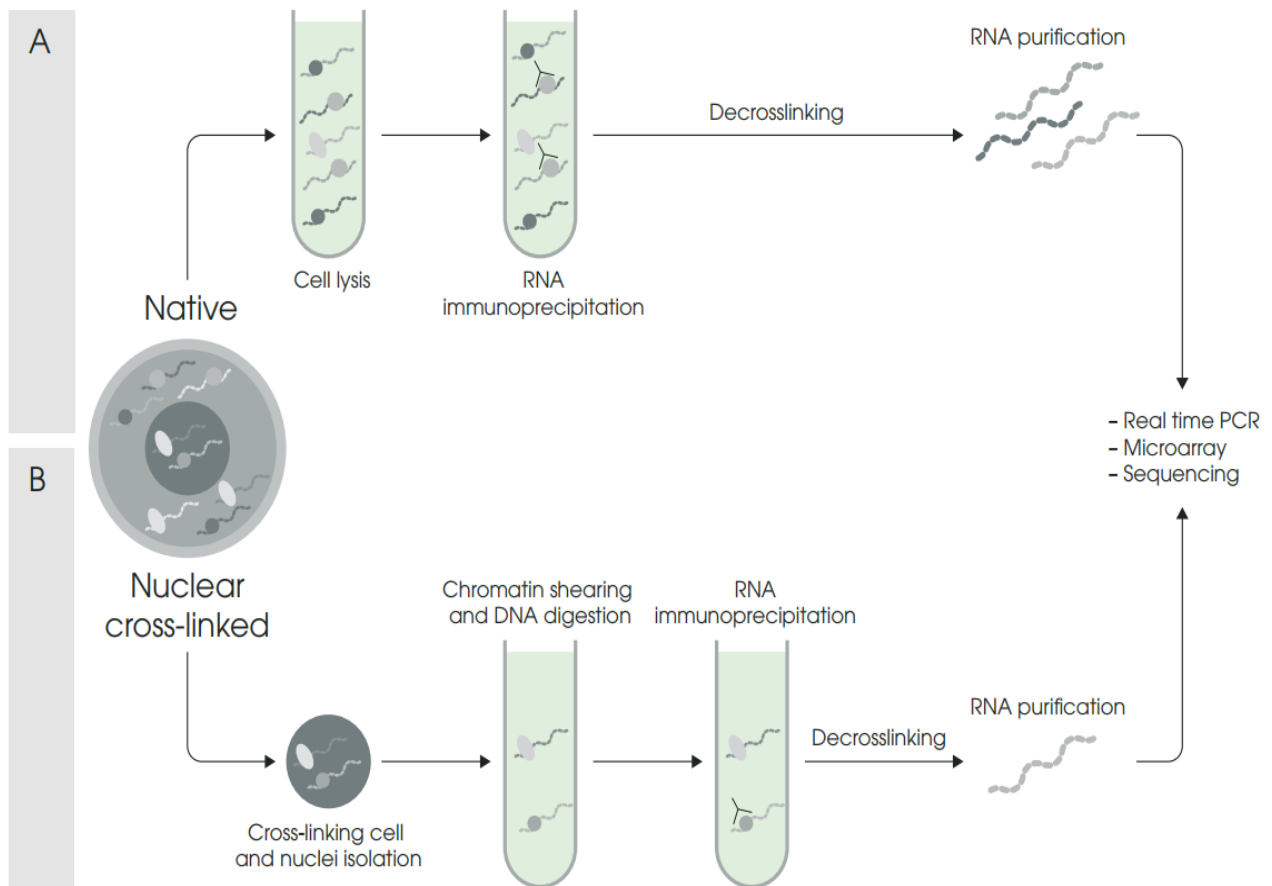


图 13. RIP 实验方案流程图示意图。(A) 使用原生方法，不进行交联。方法 (B) 使用甲醛交联。

RIP: 技术考量

RNase 污染

使用不含 RNase 的试剂(如无 RNase 的吸头、试管和试剂瓶)避免污染。使用不含 DNase、不含 RNase 的超纯蒸馏水制备缓冲液和溶液。

严谨地设置对照

整个实验过程中应保持一个或多个阴性对照品，例如无抗体样本或来自基因敲除细胞或组织的免疫沉淀。不推荐使用敲除细胞进行阴性对照实验。

下游分析

从您的下拉列表中分离出来的 RNA 可以使用多种技术分析。根据您要回答的问题选择最佳方法，并使用多种方法确认您的结果。例如，您使用 RIP-seq 获得的任何新发现都应该使用 RIP-qPCR 进行确认。

CLIP

CLIP 是一种基于抗体的技术，用于研究与 RNA 免疫沉淀 (RIP) 相关的 RNA-蛋白质相互作用，但与 RIP 不同的是，CLIP 使用紫外线交联 RNA 结合蛋白与 RNA。这种共价键是不可逆的，因而兼容严苛的纯化条件。与 RIP 不同，CLIP 提供有关 RNA 上实际蛋白结合位点的信息。

CLIP 可分为不同的类型，包括高通量测序 CLIP (HITS-CLIP)、光活化核糖核苷增强 CLIP (PAR-CLIP) 和单核苷酸分辨率交联免疫沉淀 (iCLIP)。

您可以登录 www.abcam.com/CLIP 查看我们根据 Konig *et al.* J.Vis.Exp. 2011. “ICLIP-全转录组蛋白质-RNA 相互作用的映射与个体核苷酸分辨率” 改编的完整 CLIP 实验方案。

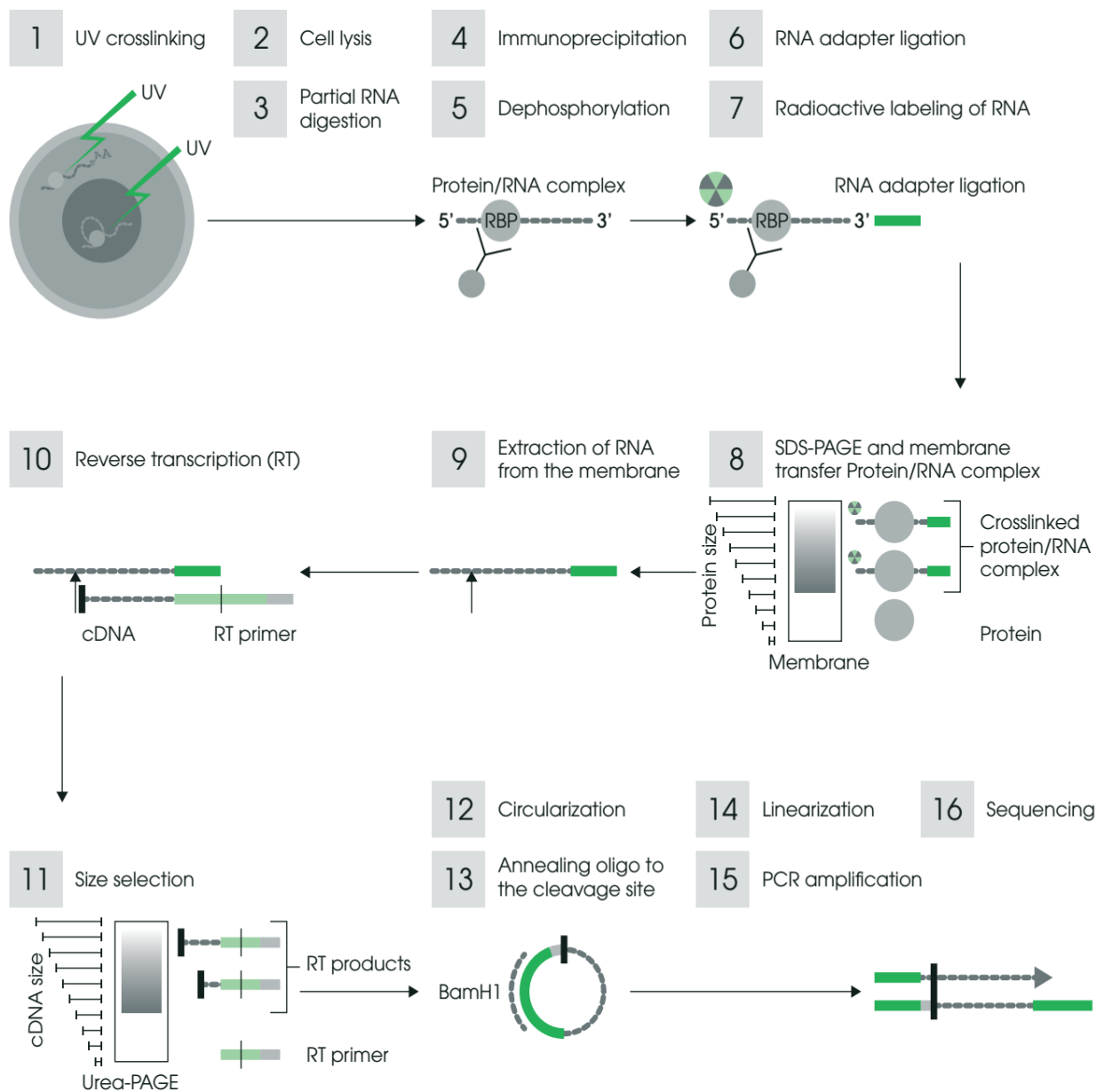


图 14. CLIP 实验方案流程示意图。

CLIP: 技术考量

4-硫尿苷预孵育

4-硫尿苷预孵育和 UV-A 交联等可选步骤对某些蛋白质而言可能是必需的。4-硫尿苷可增强某些蛋白质的交联。详情见完整实验方案。

优化抗体浓度

开始实验之前，应优化所需的抗体量 (Huppertz *et al.*, 2014)。无抗体样本是很好的阴性对照品。如果您以前未曾使用 CLIP 对您的目标靶标进行过研究，您可以先使用在 IP 中有效的一种抗体，在 IP 中的有效性即提示该抗体在 CLIP 中也会有效。

miCLIP

尽管 m6A 是真核生物 mRNA 中含量最丰富的修饰碱基，但目前对其进行准确研究的方法仍存在局限性。绘制 m6A 高分辨率图谱的新方法对理解这种表观遗传 RNA 修饰而言至关重要。

miCLIP 可以对整个 RNA 中的单个 m6A 残基和 m6A 簇进行高分辨率检测 (图 14)。使用 miCLIP，可以在人和小鼠 mRNA 中以单核苷酸分辨率绘制 m6A 和相关二甲基化形式 m6Am (N6,2'-O-二甲基腺苷) (Linder *et al.*, 2015)。

miCLIP 适用于较小的 RNA。该实验方案 (Linder *et al.*, 2015) 的作者发现，一类非编码小 RNA，小核仁 RNA (snoRNA) 中存在 m6A 修饰。若利用缺乏特异性且生物信息学存在挑战的旧技术，这一发现则是很难实现的。

登录 www.abcam.com/miCLIP，查看我们完整的 miCLIP 方案。

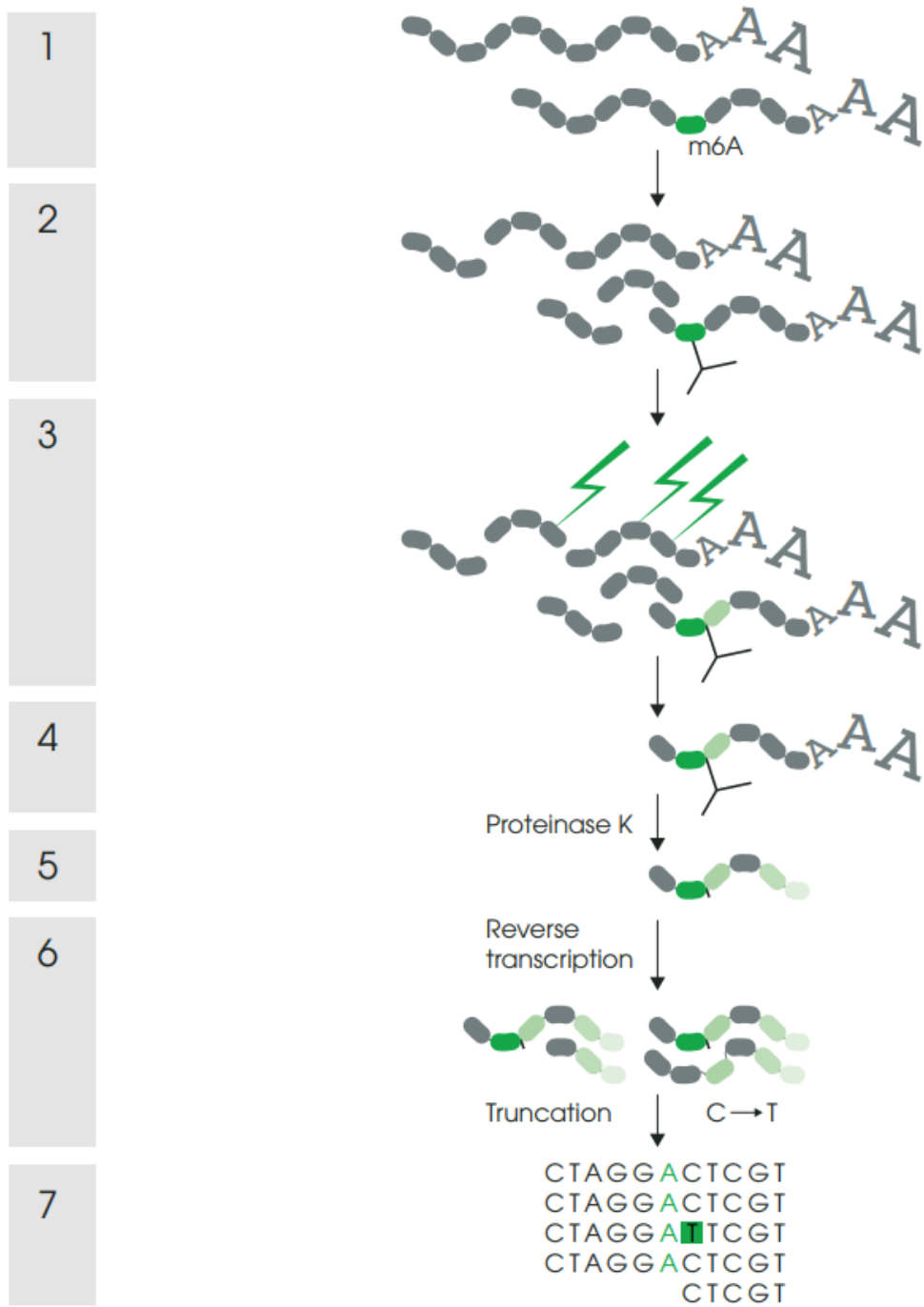


图 15: miCLIP 实验方案流程示意图

1. RNA 提取。
2. RNA 片段化，长度为 30-130 个核苷酸，并与抗 m6A 抗体一起孵育。
3. RNA 与结合抗体进行 UV 交联。
4. 通过蛋白 A/G 亲和纯化、SDS-PAGE 和硝酸纤维素膜转移回收抗体-RNA 复合物。
5. 接头连接，并利用蛋白酶 K 释放 RNA。
6. RNA 逆转录为 cDNA，进行 PCR 扩增和测序。
7. 鉴定 C-T 转换或截短，与已知的基因组序列进行对比。定位被鉴定为 m6A/m6Am 残基的结合位点，并在转录组中标注。

miCLIP: 技术考量

非 100% 准确

该方法无法识别修饰残基的具体位置，只能确定 m6A 位点的大致位置

生物信息学 m6A 调用中的偏差

数据分析使用基于已知共有序列的假设，这些序列含有 m6A 残基，因此忽略了这些基序以外的修饰。

液相色谱串联质谱法 (LC/MS-MS)

与 DNA 修饰类似，如果您可以使用 LC-MS/MS，那么 LC-MS/MS 是量化总 RNA 内 RNA 修饰量的最佳方法。此外，类似于检测 DNA 修饰，您可以使用绝对定量法，这种方法仅受您可以用作样本检测标准品的同位素标准品的限制。

使用该技术并结合 RIP (RIP-MS)，您可以确定您的 RNA 修饰抗体是否与您的目标修饰进行了结合，而且可以查看它是否与任何其他非特异性修饰进行了结合。如果您利用 RIP input 和下 pull-down 样本得到了 LC-MS/MS 数据，您应该可以看到，相较 input 而言，pull-down 样本中的目标修饰得到了富集。您还可以使用这些数据检测其他修饰，查看您的样本中是否有其他成分增加，以检测非特异性抗体结合。

LC/MS-MS: 技术考量

技术挑战

质谱设备非常昂贵且非常专业。机器本身需要大量的维护，并且往往要求其自身的技术人员掌握一切运行情况。机器操作非常复杂，需要专门的培训，因此您自己可能很难获得这种类型的质谱数据。如果您无法购买自己的 LC/MS-MS 设备，可以考虑通过合作或有偿服务获得这些数据。

RNA 修饰对照实验

由于 RNA 修饰的性质，其化学结构通常极为相似。为了确保您从您的抗体中获得最准确的结果，您需要在您的模型系统中对其进行完全检测。RNA 修饰抗体的对照品可以使用一系列的应用来完成。为简化您的 RNA 修饰研究，请查看下方我们提供的一些高级对照和提示。

RNase 处理

不管您是进行 ICC/IHC 还是进行 RIP-qPCR，都有必要为您的实验样本设置一个经 RNase 处理的对照品 (Delatte *et al.*, 2016)。举个例子，如果您在您的实验 IHC 样本中看到一个清晰、明亮的信号，但在 RNase 处理的对照样本中未得到信号，您可以确信您得到的信号来自 RNA，而不是来自非特异性来源的背景信号。这意味着抗体识别的是 RNA 内的修饰，而非 DNA 内的修饰。

- 使用 RNA 修饰抗体时，关键是要确保未检测到来自 DNA 的高水平非特异性背景信号。您可以在您的正常 RNA 修饰 IHC 或 RIP 方案中快速添加一个 RNase 处理步骤。重要的是不要让样本在 RNase 溶液中放置太久，这样会导致 DNA 降解，增加 DAPI 等复染的难度。
- 对于每种不同的样本类型，您应该检测不同浓度的 RNase，并尝试在您的样本上保留不同的时间长度。例如，根据组织类型的不同，IHC 可能需要长达 1 小时的 RNase 时间，而 ICC 需要的时间则少得多 — 尝试将 10 至 30 分钟作为起始时长。

DNase 处理

除了 RNase 处理的对照品，您还应该设置经 DNase 处理的对照品。如果您担心您的 RNA 修饰抗体正在识别 DNA 内的一种类似修饰，最好用 DNase 处理您的样本，并对此进行检测。许多修饰都会同时存在于 RNA 和 DNA 内，所以这个问题很常见。举个例子，DNA 内的 5mC 与 RNA 内的 m5C 的化学修饰相同。

- 如果您使用 RNA 修饰抗体进行 IHC，那么最好在您的实验样本旁设置一个经 DNase 处理的对照品。如果您从您的实验样本中得到了一个清晰、强烈的信号，但经 DNase 处理的对照品没有信号，表明您的抗体正在与 DNA 内的一个修饰结合。
- 对于这类对照品，优化条件也很重要。让您的样本在 DNase 处理中停留太久会导致 RNA 降解，因此一定要检测不同的 DNase 浓度和处理的持续时间。

竞争法检测

确保 RNA 修饰抗体特异性的另一种方法是使用竞争法检测。竞争法检测使用的是包含合成修饰的寡核苷酸，可与您的抗体一并预孵育 (Meyer *et al.*, 2012)。您在您的应用（例如 ICC/IHC 或斑点印迹）中使用这种预孵育抗体时，与单独使用抗体染色的样本比较后，您应该会看到获得的信号有所降低。您可以尝试将竞争性寡核苷酸添加到您的抗体溶液中，并不断增加溶液浓度；您会看到信号呈梯度递减，反映了您添加到抗体中的竞争物的量。例如，尝试按 0 ng、10 ng、100 ng 和 1 μ g 的梯度添加竞争性寡核苷酸。

斑点印迹法 (Dot blot)

使用 RNA 修饰抗体进行斑点印迹法是检测其特异性的一个快速而简单的方法。斑点印迹法类似于简化版本的蛋白质印迹法。该技术的操作方法为，将样本直接点样到膜上，交联，然后进行印迹。更多详情，请查看我们的斑点印迹法实验方案。如果您可以获得包含目标修饰的合成 RNA 分子，可以将其作为最佳阳性对照品。同样，装载未修饰的分子或含有不同修饰的分子可以作为阴性对照品，并帮助您测量任何非特异性结合或交叉反应性。

- 对于您的实验样本，可以使用正确的对照品运行斑点印迹法来检测您的 RNA 修饰抗体是否具有特异性。对于阴性对照品，将含有敲除 (KO) 的样本用于负责产生特异性 RNA 修饰的酶 (Jia *et al.*, 2011)。
- 如果将野生型和 KO 样本的 RNA 加载到膜上运行斑点印迹法，您应该会看到两个样本之间存在明显差异。使用靶向目标 RNA 修饰的抗体对膜进行染色时，野生型样本将显示清晰的信号，而 KO 应显示无色。

RIP-MS

要是您能够使用 LC-MS/MS，那么 LC-MS/MS 确实是检测 RNA 修饰抗体特异性的最佳方法 (Kellner *et al.*, 2014)。使用该技术并结合 RIP (RIP-MS)，您可以确定您的抗体是否仅与您的目标修饰进行了结合。

- 使用绝对或相对定量方法，您可以通过 LC-MS/MS 对在任何生物体和细胞类型的总 RNA 中发现的所有 RNA 修饰进行平行定量。如果您利用 RIP input 和 pull-down 样本得到了 LC-MS/MS 数据，您应该可以在 pull-down 样本中看到您的目标修饰相对于 input 的富集。
- 您还可以使用这些数据检测其他修饰，查看您的样本中是否有其他成分增加，以检测非特异性抗体结合。目前正在开发的软件可以帮您进行此类分析 (Yu *et al.*, 2017)。

参考文献

- Delatte B, Wang F, Ngoc LV, Collignon E, Bonvin E, Deplus R, Calonne E, Hassabi B, Putmans P, Awe S, Wetzel C, Kreher J, Soin R, Creppe C, Limbach PA, Gueydan C, Krusys V, Brehm A, Minakhina S, Defrance M, Steward R, Fuks F. RNA biochemistry. Transcriptome-wide distribution and function of RNA hydroxymethylcytosine. (2016) *Science*. 2016 15:282-5
- Hendrickson DG, Hogan DJ, Herschlag D, Ferrell JE, and Brown PO (2008). Systematic Identification of mRNAs Recruited to Argonaute 2 by Specific microRNAs and Corresponding Changes in Transcript Abundance. *PLoS One* 3 (5), 2126.
- Hendrickson DG, Hogan DJ, McCullough HL, Myers JW, Herschlag D, Ferrell JE, and Brown PO (2009). Concordant Regulation of Translation and mRNA Abundance for Hundreds of Targets of a Human microRNA. *PLoS Biology* 7 (11), 2643.
- Huppertz *et al.* iCLIP: Protein-RNA interactions at nucleotide resolution. *Methods*. (2014).
- Jia G, Fu Y, Zhao X, Dai Q, Zheng G, *et al.* (2011). N6-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat. Chem. Biol.* 7:885-87
- Kellner S, Ochel A, Thüring A, Spenkuch F, Neumann J, Sharma S, Entian KD, Schneider D, and Helm M. (2014) Absolute and relative quantification of RNA modifications via biosynthetic isotopomers. *Nucleic Acids Res.* 42(18): e142.
- Khalila AM, Guttman M, Huarte M, Garbera M, Rajd A, Morales DR, Thomas K, Pressera A, Bernstein BE, Oudenaarden AV, Regeva A, Lander ES, and Rinn JL (2009). Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *PNAS* 106, 11667-72.
- Kirchner, S., and Ignatova, Z. (2015). Emerging roles of tRNA in adaptive translation, signalling dynamics and disease. *Nat. Rev. Genet.* 16, 98-112.
- König *et al.* J. iCLIP -Transcriptome-wide Mapping of Protein-RNA Interactions with Individual Nucleotide Resolution. *Vis. Exp.* (2011).
- Linder B *et al.* Single-nucleotide-resolution mapping of m6A and m6Am throughout the transcriptome. *Nat Methods* 12:767-72 (2015)
- Mauer J *et al.* Reversible methylation of m(6)Am in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature* 541:371-375 (2017).
- Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, Elemento O, Mason CE, Jaffrey SR. (2012) Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell* 1635-46
- Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E, and Chang HY (2007). Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 129, 1311-1323.
- Roundtree, I., Evans, M., Pan, T., & He, C. (2017) Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation. *Cell*, 1187-1200
- Stuart, J.W., Koshlap, K.M., Guenther, R., and Agris, P.F. (2003). Naturally occurring modification restricts the anticodon domain conformational space of tRNA (Phe). *J. Mol. Biol.* 334, 901-918.
- Yu N, Lobue PA, Cao X, Limbach PA. (2017) RNAModMapper: RNA Modification Mapping Software for Analysis of Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Data. *Anal Chem* 10744-1075

