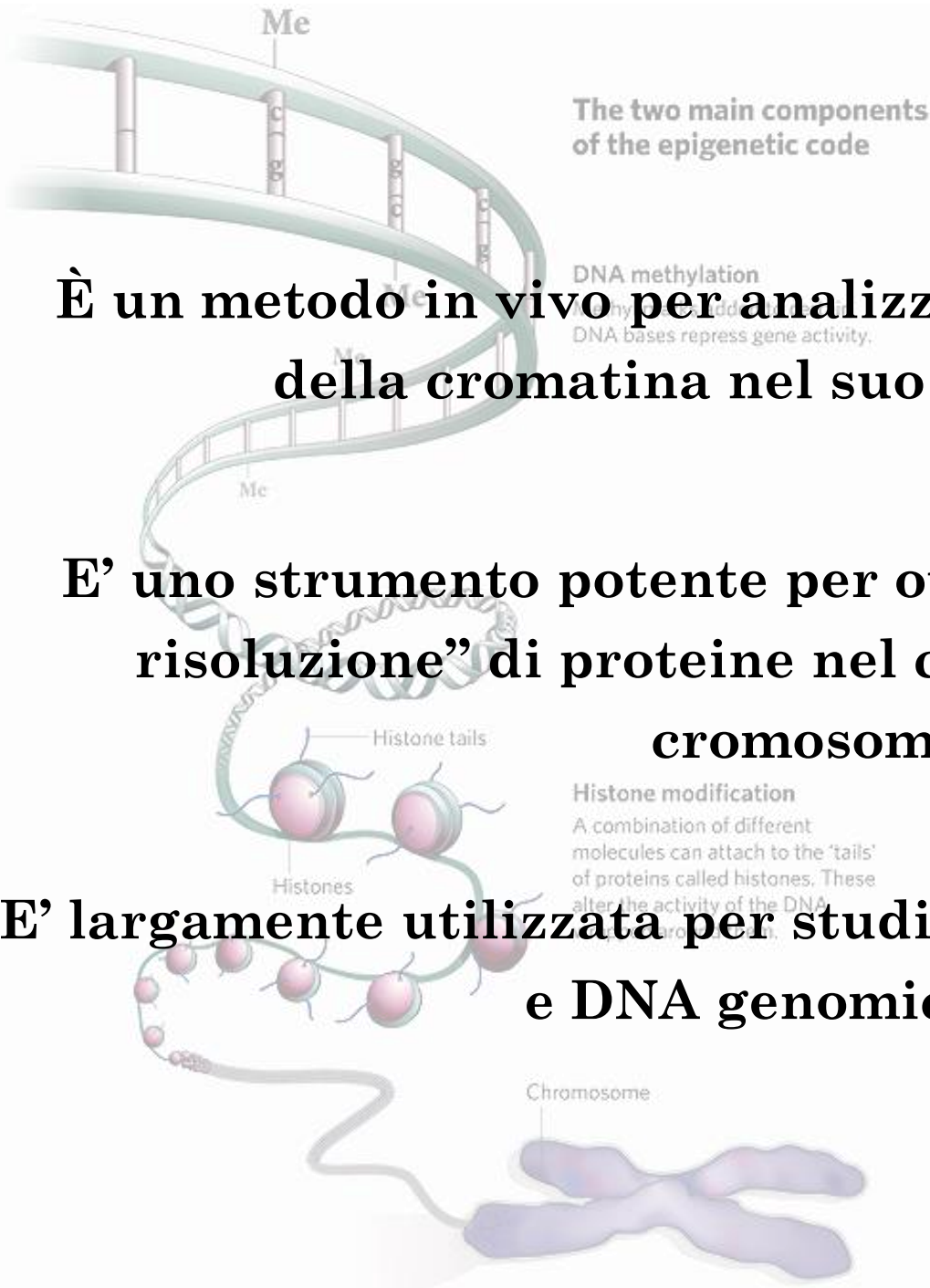


**ChIP**  
**Chromatin Immuno Precipitation**



The two main components of the epigenetic code

DNA methylation  
Methyl groups added to DNA bases repress gene activity.

Histone modification  
A combination of different molecules can attach to the 'tails' of proteins called histones. These alter the activity of the DNA.

**È un metodo in vivo per analizzare qualsiasi componente della cromatina nel suo contesto naturale**

**E' uno strumento potente per ottenere "immagini ad alta risoluzione" di proteine nel contesto delle strutture cromosomiche**

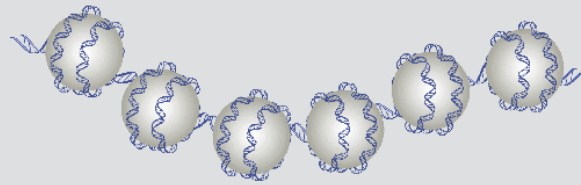
**E' largamente utilizzata per studiare l'interazione di proteine e DNA genomico in vivo**



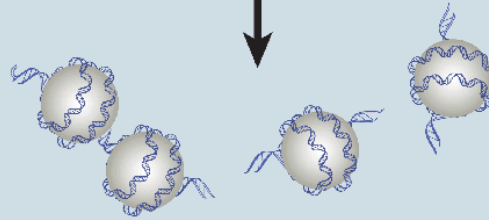
## **Il principio della ChIP:**

**arricchimento selettivo  
della frazione di cromatina  
contenente una specifica proteina**

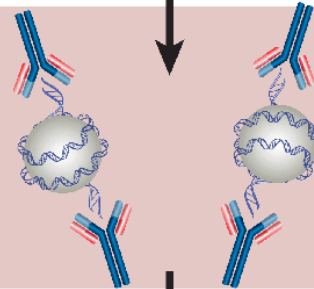
Crosslink



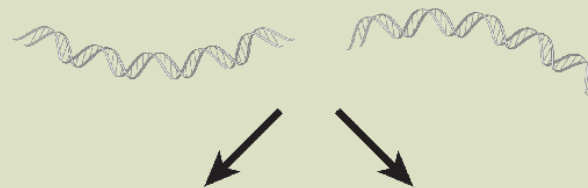
Chromatin Fragmentation



Immunoprecipitation

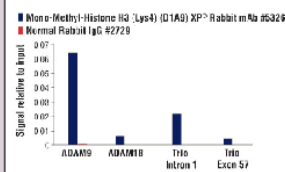


DNA Purification

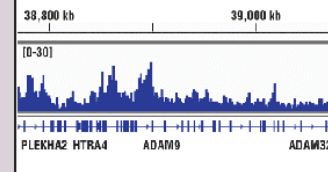


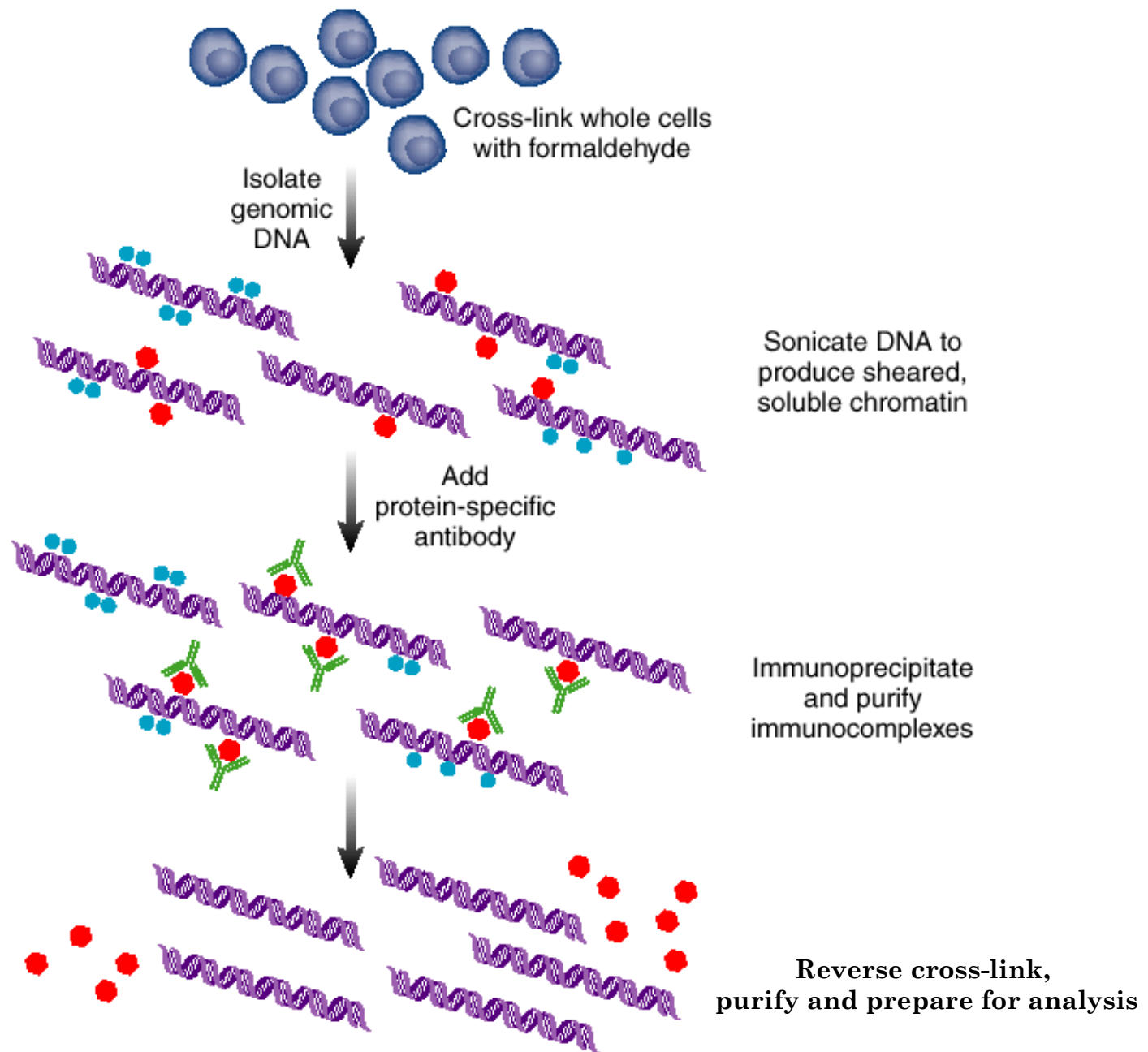
DNA Analysis

ChIP-qPCR

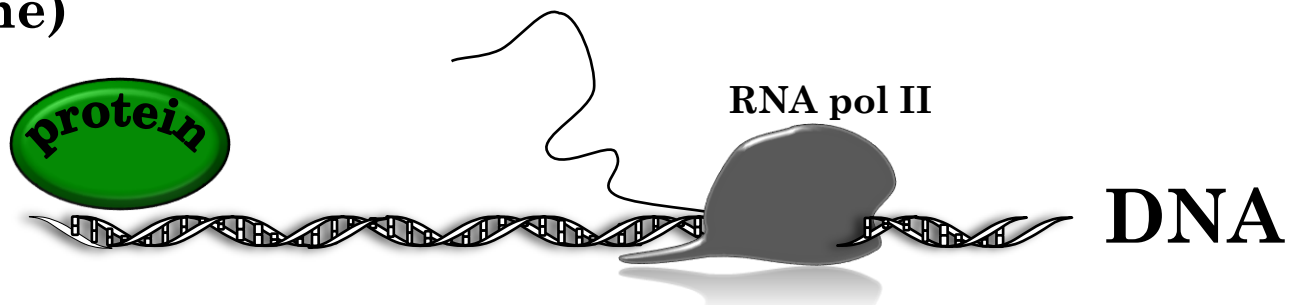


ChIP-seq





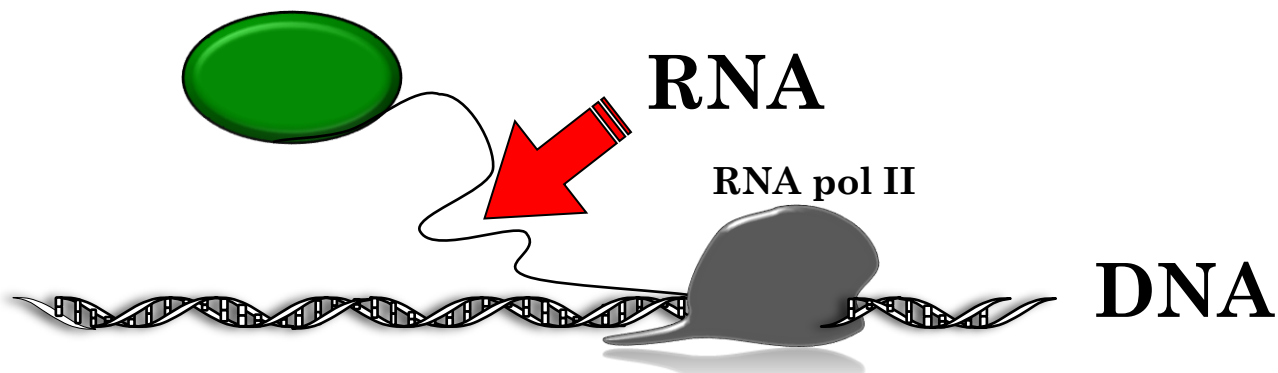
La ChIP è stata usata per mappare diversi fattori coinvolti in processi correlati con il DNA (replicazione, modificazione, trascrizione)



.....e per mappare altri fattori associati con i complessi di trascrizione, ma

**NON direttamente**

Associati con il DNA (enzimi di capping dell' mRNA, ed altri fattori coinvolti nella maturazione dell' RNA).



# ChIP

## Chromatin Immuno Precipitation

Ha arricchito notevolmente le  
nostre conoscenze su come i geni  
sono regolati nel loro contesto  
naturale





# Esistono due principali tecniche di ChIP

**N-ChIP:** cromatina nativa

-gli antigeni non sono sicuramente nascosti o modificati dal cross-link

-solo proteine strettamente associate con la cromatina possono essere immunoprecipitate



**X-ChIP:** cromatina cross-linked (sia chimicamente FA che con UV) come substrato

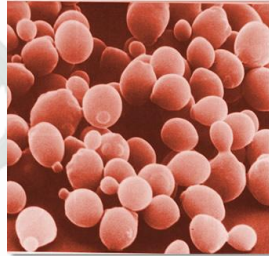


Quest' ultima è molto più usata dell' N-ChIP

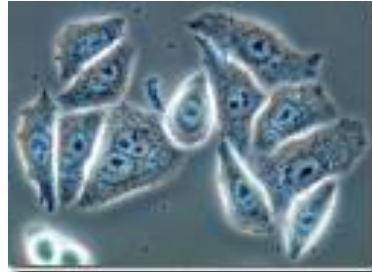
# Materiali di partenza: la cromatina

La cromatina estratta da diverse fonti/organismi è un substrato idoneo per la ChIP

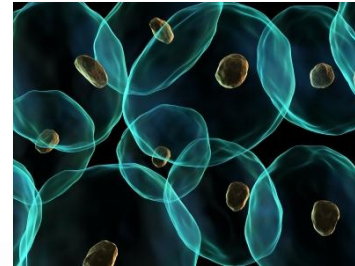
yeast



tissue culture cells



homogeneous cell suspension



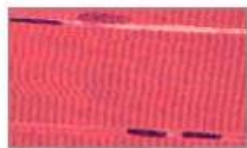
tissue



Connective tissue



Epithelial tissue



Muscle tissue

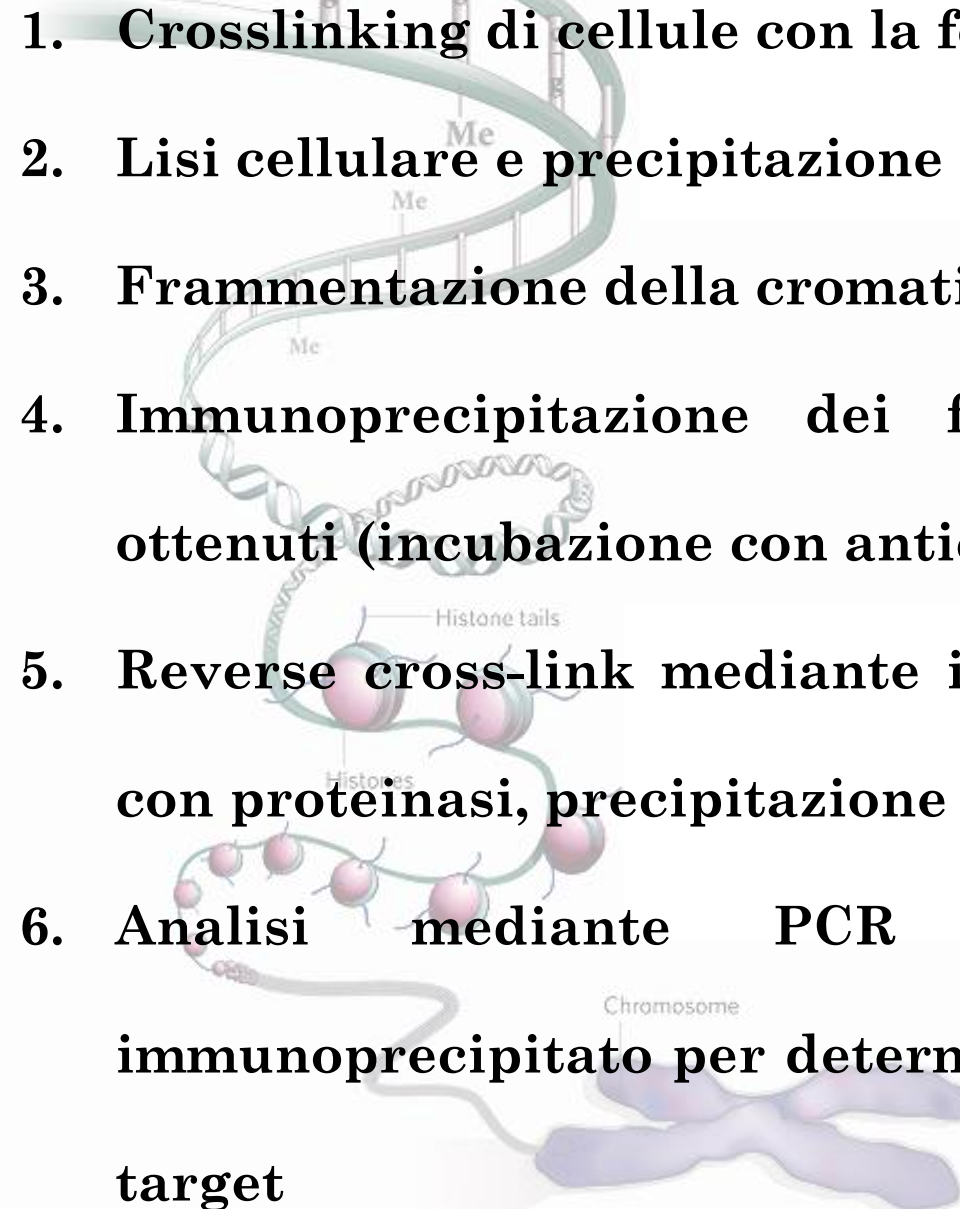


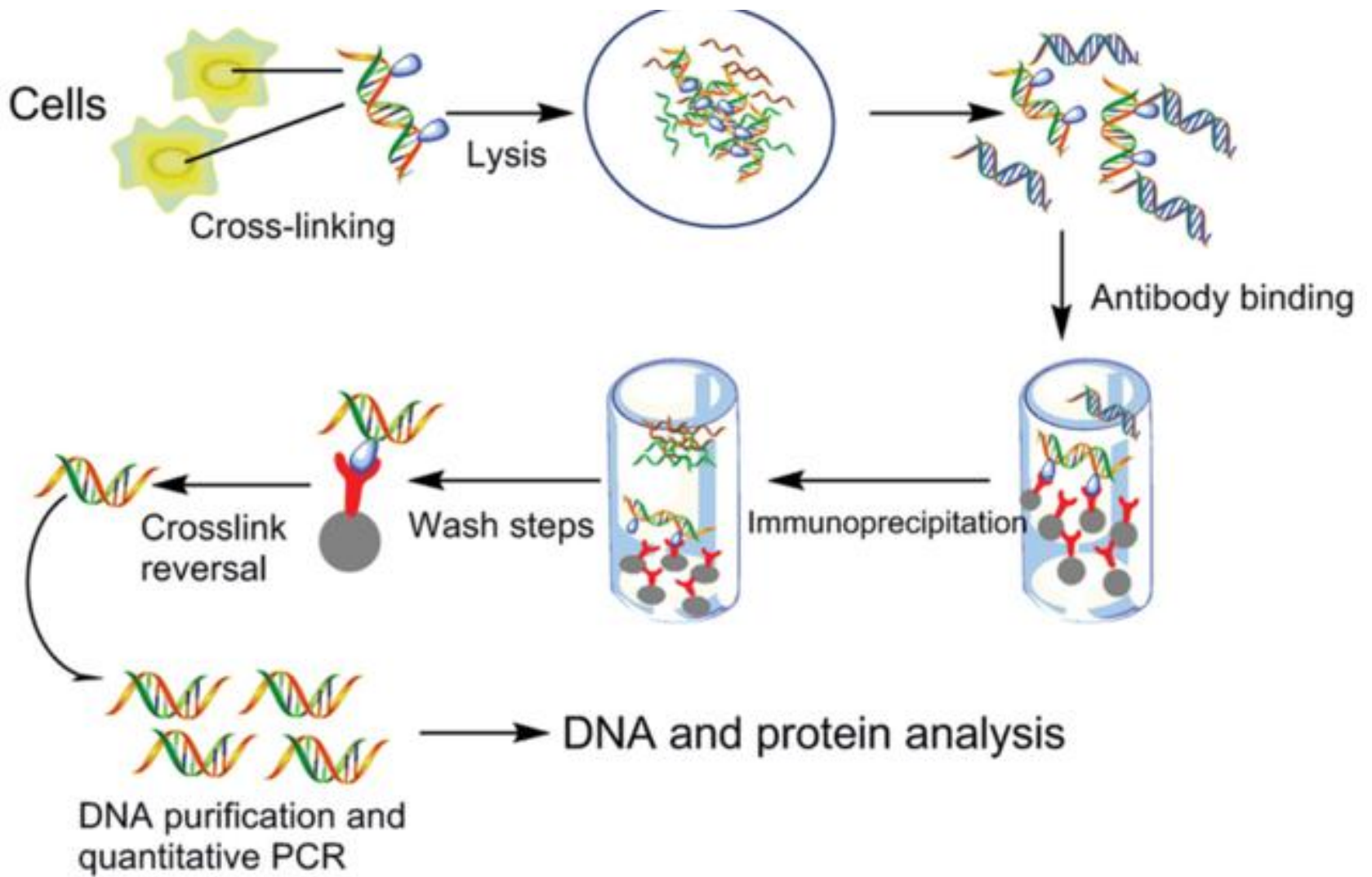
Nervous tissue

plants

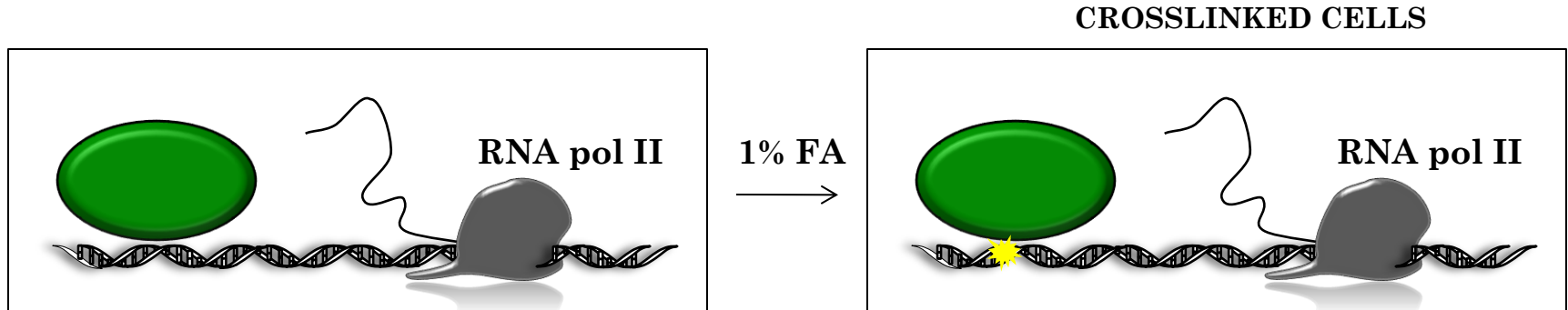


# Protocollo di XChIP

1. **Crosslinking di cellule con la formaldeide in vivo**
  2. **Lisi cellulare e precipitazione dell'intero estratto cellulare**
  3. **Frammentazione della cromatina mediante sonicazione**
  4. **Immunoprecipitazione dei frammenti di cromatina così ottenuti (incubazione con anticorpo)**
  5. **Reverse cross-link mediante incubazione a 65° C, digestione con proteinasi, precipitazione del DNA**
  6. **Analisi mediante PCR della frazione di DNA immunoprecipitato per determinare il livello di una sequenza target**
- 

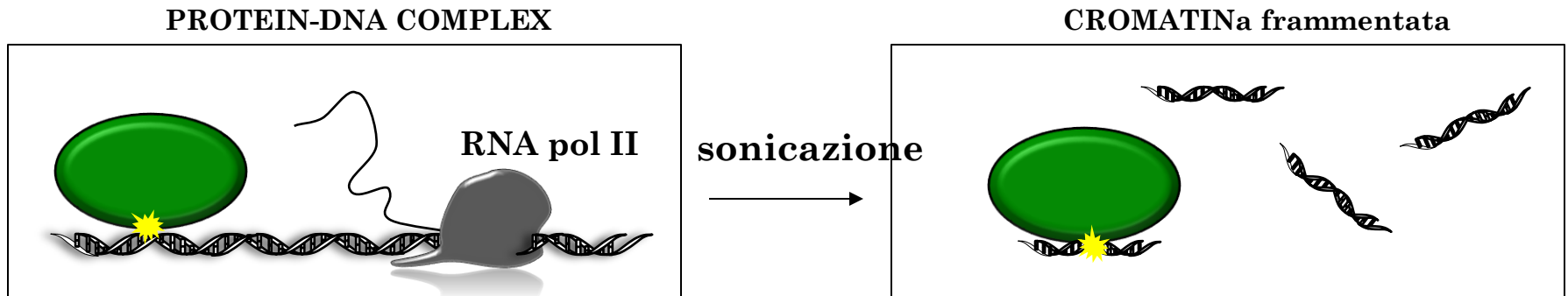


# 1- cross-linking con formaldeide



- FA si lega agli aminogruppi primari (ex: K in proteins, side chains of A,C,G in DNA)
- Cross link avviene sia dei legami DNA-proteina che proteina-proteina (distanza di circa 2Å)
- è solubile in acqua, penetra facilmente le membrane biologiche
- il legame è reversibile a 65° C
- 1% FA è la concentrazione normalmente utilizzata
- la durata del trattamento va ottimizzata (normalmente 5-10 min a RT)
  - Tempi più lunghi: cross linking proteina-proteina più esteso
  - riduzione dell'efficienza della frammentazione della cromatina
  - masking/modifica degli epitopi
- blocco della reazione con glicina 0.125M che fornisce un eccesso di ammino gruppi

# Frammentazione della cromatina e purificazione



- dopo la lisi cellulare la cromatina viene isolata

- la frammentazione è necessaria perché frammenti più piccoli di DNA forniscono una maggior risoluzione per il mapping e ridotto background nell'immuno precipitazione

- la sonicazione è il metodo d'elezione



Range dei frammenti:

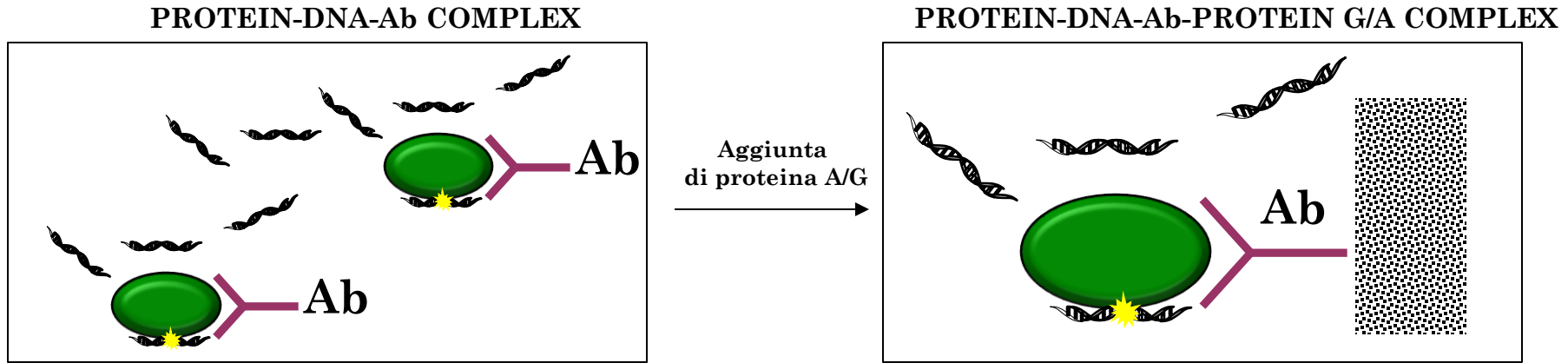
0.5-1kB

ctrl su gel!!

500bp

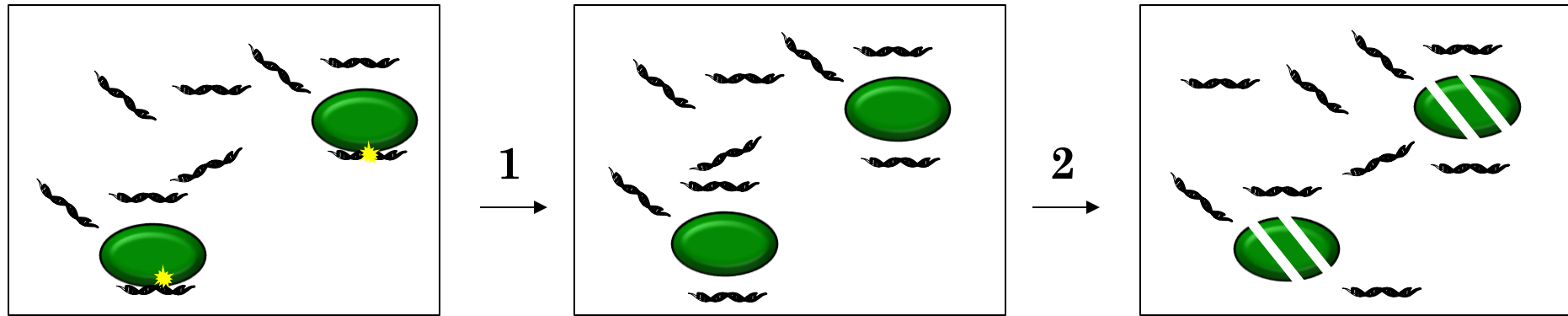
300bp

# Immunoprecipitazione



- La qualità dell'anticorpo è fondamentale in questa fase
- Deve riconoscere la proteina legata al DNA
- Deve essere altamente specifico
- Necessaria una pre-taratura per ridurre il legame aspecifico
- Gli immunocomplessi sono poi precipitati con ProtG/A Sepharose (lega la regione Fc dell'anticorpo)
- lavaggi stringenti riducono il background

# Reverse Crosslink, proteolisi e isolamento del DNA



- 1) Reverse crosslinks

incubazione a 65°C

- 2) digestione RNA e proteine

RNAse A + ProteinaseK

- 3) purificazione DNA

Phenol/Chloroform

Affinity column

- 4) analisi della frazione immunoprecipitata

## **Nota bene.....**

**- quantità di materiale:**

**può essere critica, anche a seconda di come viene trattato**

**- qualità dell' anticorpo:**

**se è specifico è meglio purificato per affinità**

**- background DNA:**

**può dare percentuali anche elevate di falsi positivi**

# Cultura di lievito

↓  
Formaldehyde crosslinking

↓  
Glycine stop

↓  
Lisi cellulare con biglie di vetro

↓  
Sonicazione della cromatina

↙  
100µl aliquot  
(INPUT)

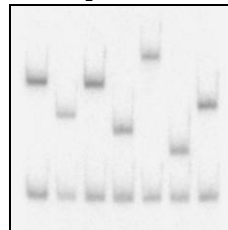
↘  
800µl aliquot

**INPUT**

↓  
Decrosslink

↓  
Precipitazione  
DNA

100µl INPUT



↓  
+Antibody-resin

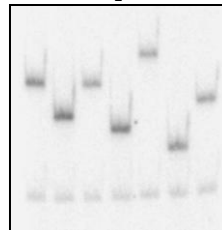
↓  
Immunoprecipitazione

↓  
Lavaggi

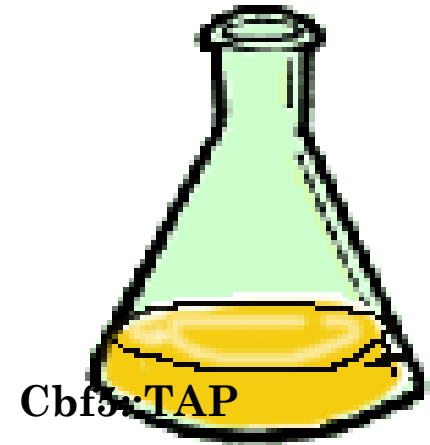
↓  
Decrosslink

**IP**

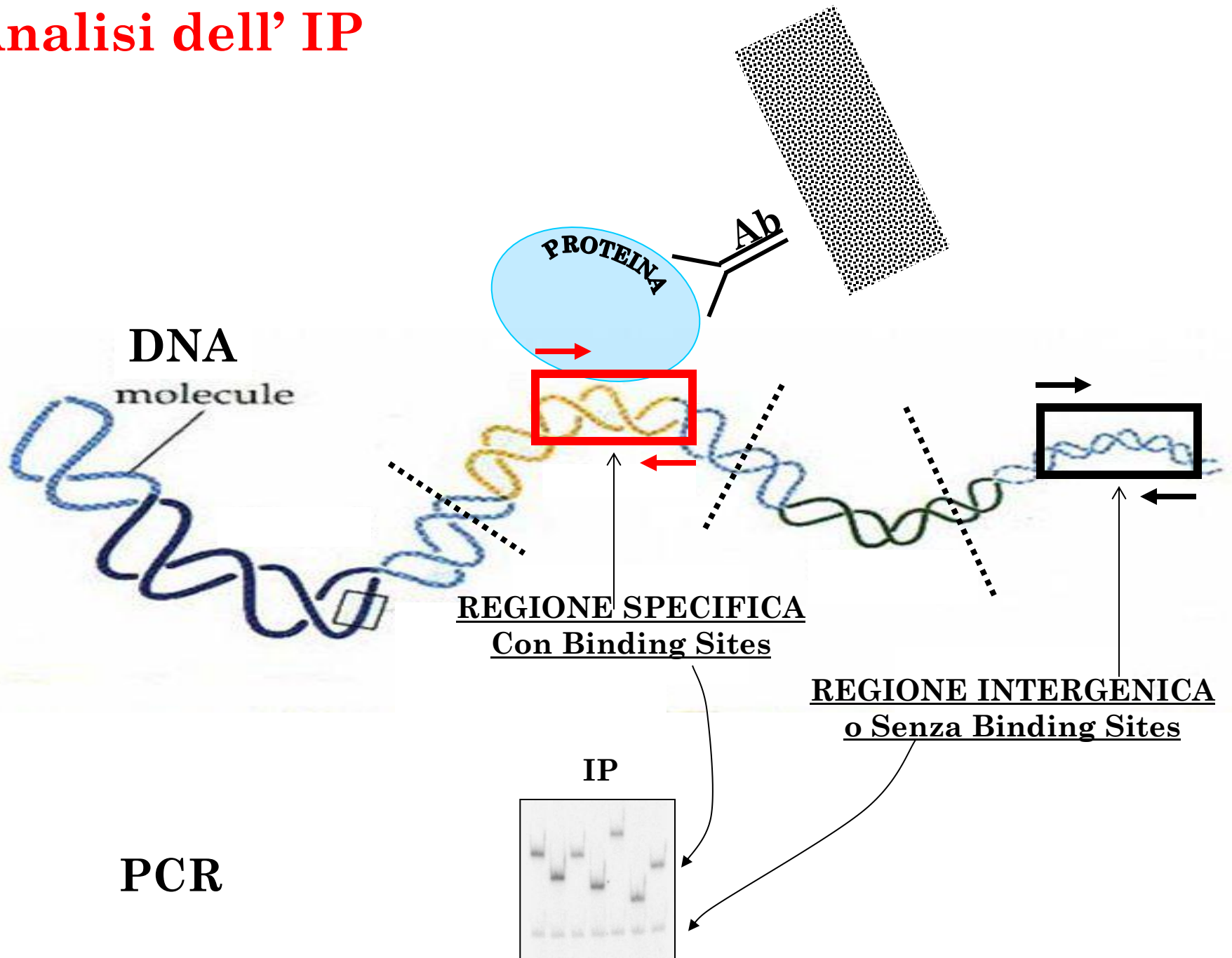
100µl IP



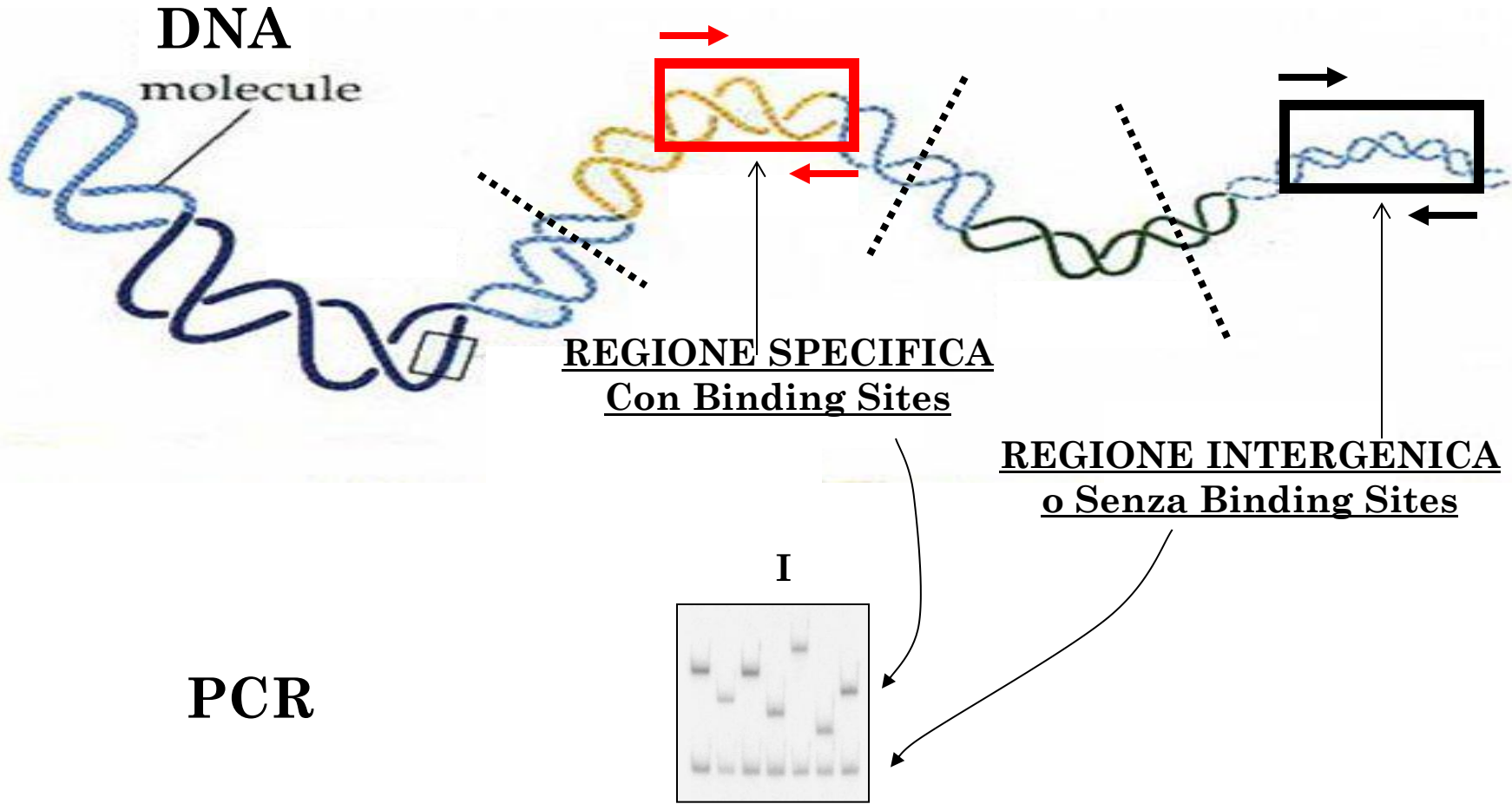
**PCR**



# Analisi dell' IP

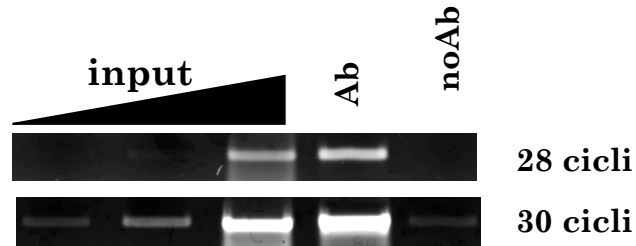


# Analisi dell' INPUT

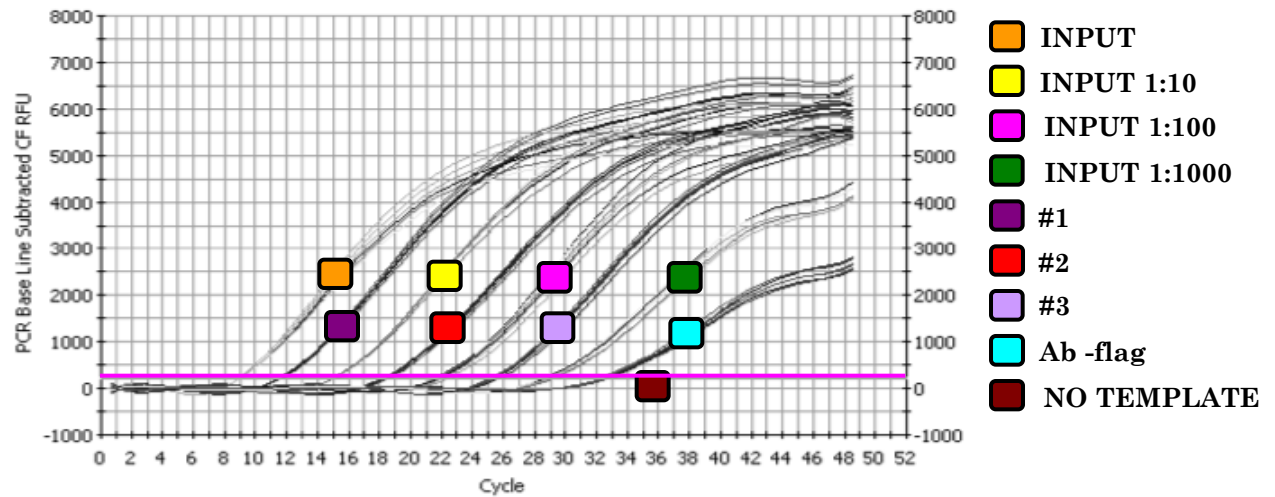


# Analisi dell'IP

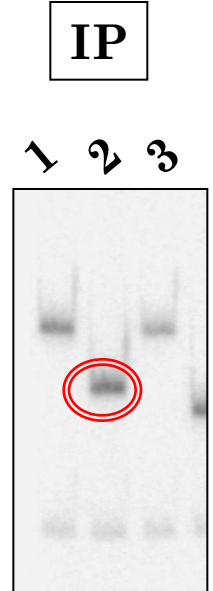
Semi quantitative  
PCR



q-PCR

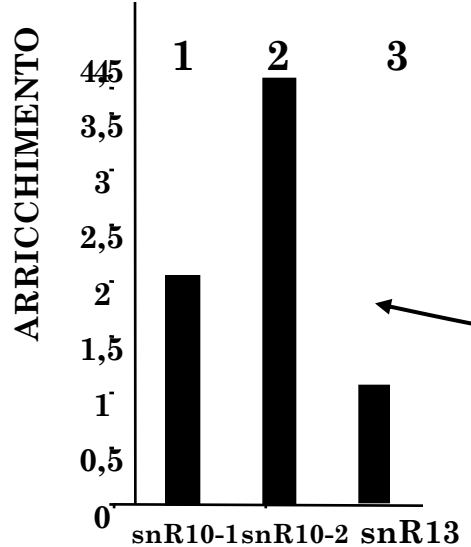
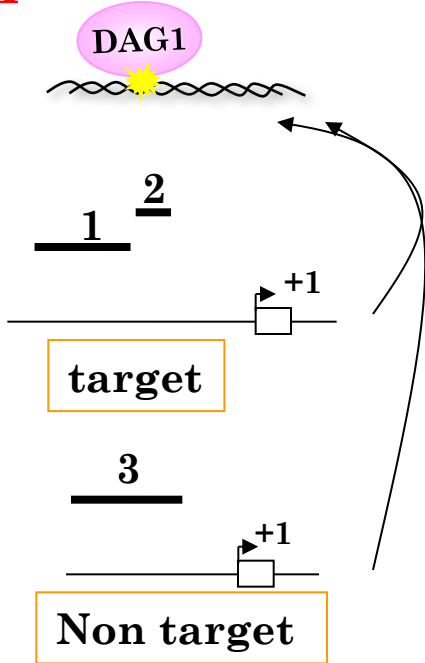


# Analisi per PCR della frazione immunoprecipitata per determinare il livello della sequenza target di DNA



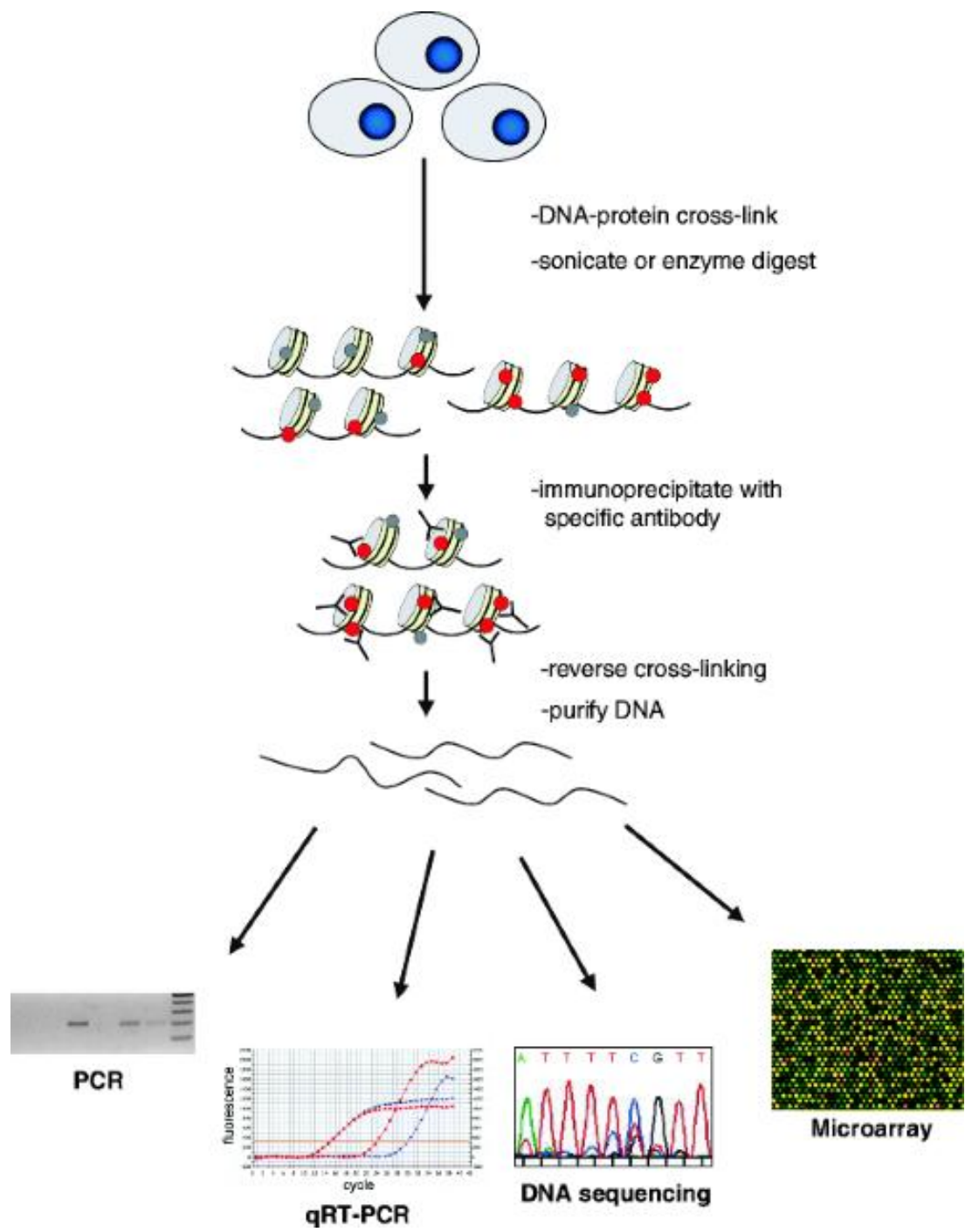
← Specific region →

← Intergenic region →



**ARRICCHIMENTO:**

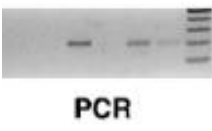
$$\frac{(\text{sp/int})^{\text{IP}}}{(\text{sp/int})^{\text{I}}}$$



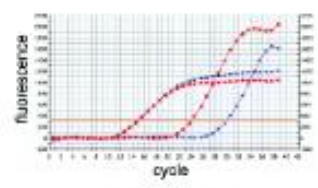
-DNA-protein cross-link  
-sonicate or enzyme digest

-immunoprecipitate with  
specific antibody

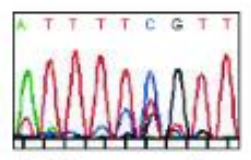
-reverse cross-linking  
-purify DNA



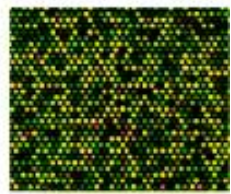
PCR



qRT-PCR



DNA sequencing

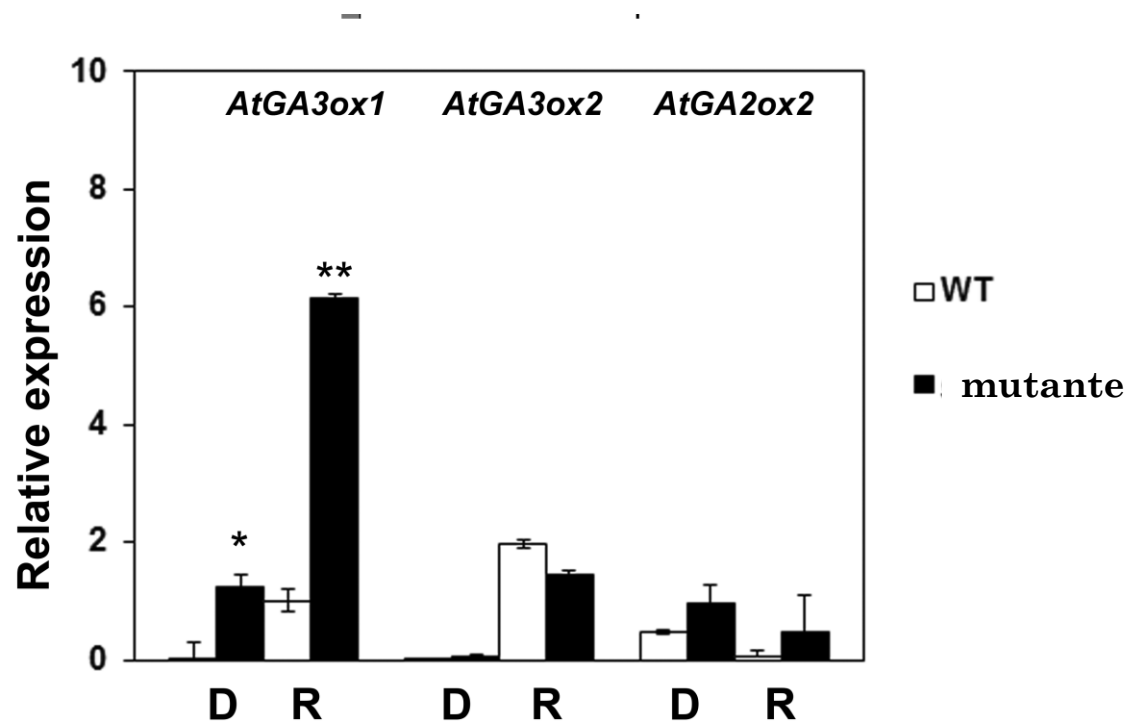


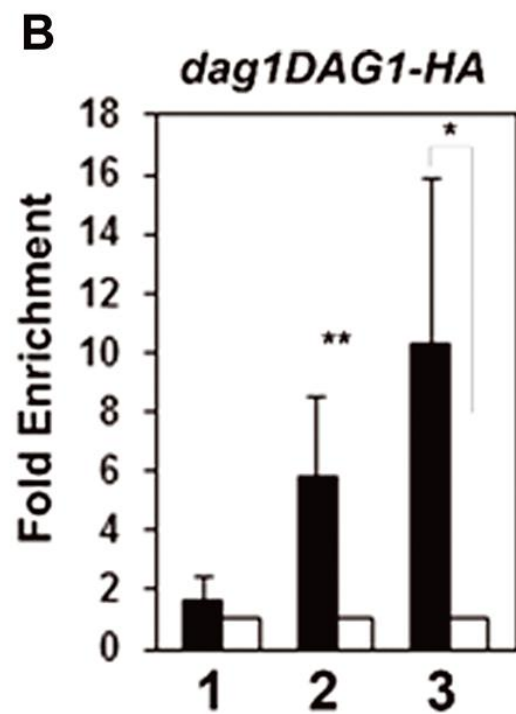
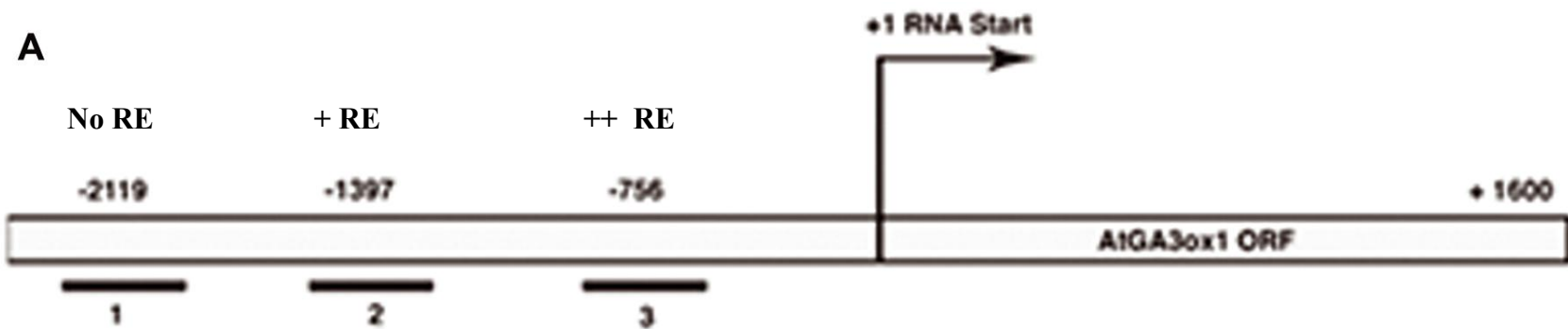
Microarray

# 1° caso: analisi di un potenziale target

già noto.....

analisi d'espressione tra mutante e wild type





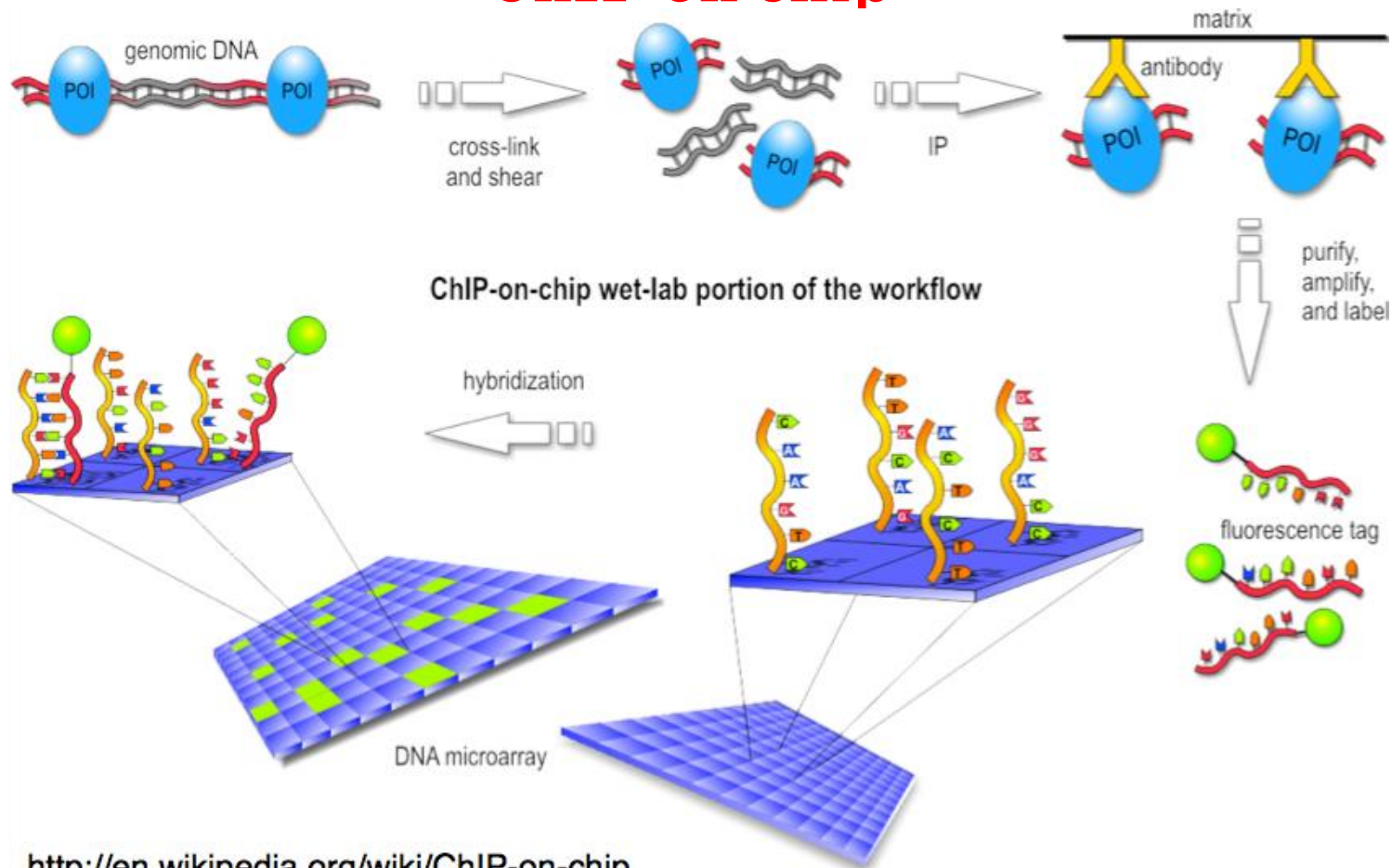
**2° caso: identificazione genome- wide**

**Dei targets di un FT**

# Genome wide ChIP

Chip-chip	ChIP-seq
Also know as chip-on-chip where the assay is performed on a glass slide	Also known as ChIP- sequencing
It's a microarray technique, based on hybridization of DNA	It's a sequencing technique, based on the application of DNA
Sequencing specific probes immobilized on a slide and hybridize with a DNA	Sequence of a DNA is amplified and sequenced in a massively parallel sequencing.
Prior sequencing information is required	Prior sequence information isn't required
Comparatively cheaper	Very costly
Sensitivity is low	Sensitivity is high

# ChIP on chip



<http://en.wikipedia.org/wiki/ChIP-on-chip>

