

Orange ChIP Kit 簡易プロトコール (version 01)

詳細については Instruction Manual (英文、又は日本語訳) を参照
(Code No. 317-80621)

キット内容 (18 回分)

断片化モジュール (ステップ 1、2)		
内容	容量	保存温度
1.25 M glycine	10 ml	4
Buffer A (クロマチン断片化)	5 ml	4

抗体モジュール (ステップ 3)		
内容	容量	保存温度
Antibody anti-histone modification : H3K4me3	20 µl	-20

ChIPモジュール (ステップ 3、4)		
内容	容量	保存温度
Buffer B (5 × ChIP)	5 ml	4
Protease inhibitor mix (P.I.) *	1 タブレット	-20
pre-blocked protein A coated beads	880 µl	4 (凍結厳禁)
Wash buffer - 1	10 ml	4
Wash buffer - 2	20 ml	4
Wash buffer - 3	20 ml	4
Buffer C (溶出)	10 ml	4
5M NaCl	400 µl	4
DNA co-precipitant	100 µl	-20
DNA precipitant	1,000 µl	4
H ₂ O	10 ml	4

* : タブレットを400 µlの水に溶かし、-20 で保存してください。

定量PCRモジュール (ステップ 5)		
(定量PCR用プライマー)		
内容	容量	保存温度
c-fos promoter primer pair	50 µl	-20
b-actin promoter primer pair	50 µl	-20
Myoglobin exon 2 primer pair	50 µl	-20
BMX primer pair	50 µl	-20

マニュアル類	
Instruction Manual (英文マニュアル)	1部
Instruction Manual (日本語訳)	1部
簡易プロトコール (本紙)	1部

スターティングマテリアル

培養細胞 必要な細胞数 : 10⁵ 細胞 / ChIP

キット以外に必要なもの

試薬・消耗品

- ・ ラボ用手袋 (すべての操作で着用)
- ・ オートクレーブ滅菌済みのピペットチップ
- ・ RNase/DNase-free の1.5 ml (及び 2 ml) チューブ
- ・ その他のチューブ: PCR チューブ, 15 ml 及び 50 ml コニカルチューブ
- ・ セルスクレーパー (ステップ 1-A スクレーピングメソッド)
- ・ トリプシン-EDTA (ステップ 1-B 細胞カウント、トリプシンメソッド)
- ・ ホルムアルデヒド (37%(w/v)ストック溶液)
- ・ 氷冷した PBSバッファー
- ・ 水
- ・ フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1)
- ・ クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1)
- ・ エタノール 100%
- ・ エタノール 70%
- ・ リアルタイムPCR試薬
- ・ RNase (1 µg/µl)
- ・ アガロース
- ・ TAEバッファー
- ・ DNA分子量マーカー

装置

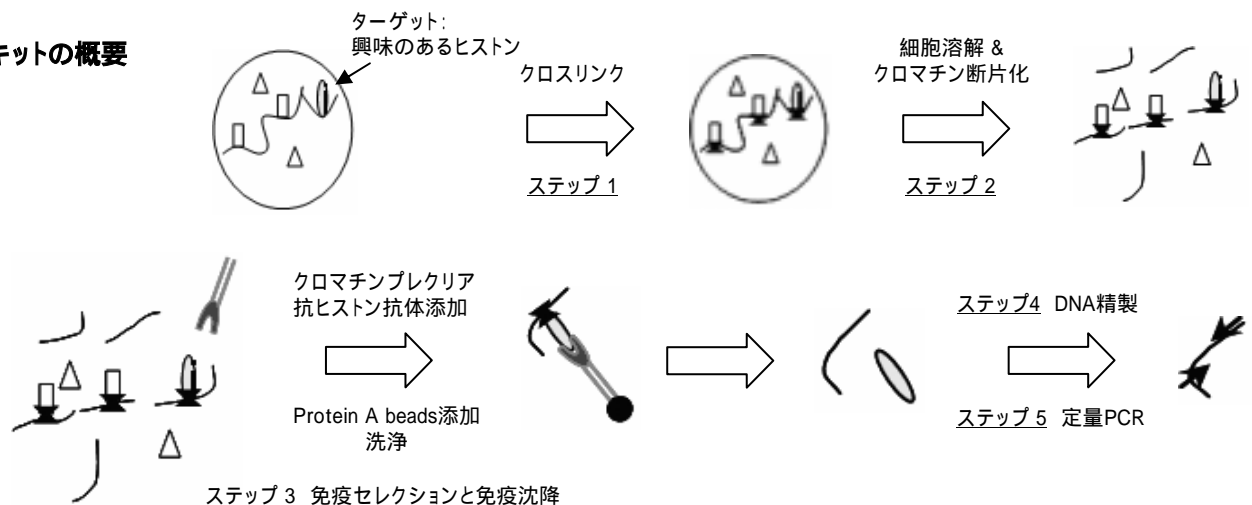
- ・ 冷却遠心機 (1.5 ml チューブ用)
- ・ 遠心機 (15 ml 及び 50 ml チューブ用)
- ・ 振とう台
- ・ セルカウンター
- ・ 密閉式超音波細胞破碎装置 Bioruptor™ *
- ・ ローテーター
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ サーモシェーカー (65)
- ・ 微量遠心機とローテーターのある低温室
- ・ リアルタイムPCR装置
- ・ アガロースゲル電気泳動装置

* : Bioruptor™はコスモ・バイオから販売されています。

Orange ChIP Kitのタイムスケジュール

工程	日程	所要時間
ステップ 1 細胞の固定と回収	1日目	30分間
ステップ 2 細胞溶解とクロマチン断片化	1日目	20分間
ステップ 3 プレクリア	1日目	75分間
免疫セレクション	1日目	15分間 + 一晚
免疫沈降	2日目	1時間
ビーズ洗浄	2日目	1.5時間
ステップ 4 DNA精製	2日目	5時間
ステップ 5 定量PCR	3日目	4時間

キットの概要



ステップ 1 - 細胞の固定と回収

細胞がコンフルエントに達したら、以下のプロトコールを開始する。

<ステップ 1-A ヒストンChIPのためのスクレーピングメソッド >

培養細胞

終濃度1%となるように37%ホルムアルデヒドを培地に直接添加
振とう台で穏やかにインキュベート(10分間、室温)
1.25 M glycine 1/10量添加 (終濃度125 mM)
均一に混合する (クロスリンクの停止)
培地を除く
氷冷した 1×PBS 10 mlで細胞を洗浄
バッファーを除く
氷冷した 1×PBS 10 mlで細胞を洗浄
バッファーを除く
Buffer A 500 μl 添加
スクレーピングで細胞を集める
細胞を15 ml チューブに移す
細胞懸濁液の終濃度を 10⁷ 細胞 / 800 μlに調整する。
(Buffer Aで調整)

ステップ 2へ

< ステップ1-B 細胞カウントのためのトリプシンメソッド >

1×PBS、培地、トリプシン-EDTA を温めておく

培養細胞

培地を除く
温めておいた 1×PBS で細胞をリンス
(3×10⁶ 細胞に 3.5 ml、1×10⁷ 細胞に 10 ml)
振とう(2分間)
バッファーを除く
トリプシン-EDTA 添加
(3×10⁶ 細胞に 1 ml、1×10⁷ 細胞に 3 ml)
インキュベート(1分間)
細胞がフラスコの底から剥がれたことを目視にて確認
すばやく培地添加 (トリプシンの中和)
(3×10⁶ 細胞に 2 ml、1×10⁷ 細胞に 6 ml)
[培地 - 細胞] 混合液でフラスコの側面を洗い流す
細胞を15 ml 又は 50 ml チューブに移す

細胞をカウントする

ステップ 2 - 細胞の溶解とクロマチンの断片化

ステップ 1の細胞懸濁液(クロマチンを含む)

適当なチューブに移す

注意: 1.5 ml チューブに 300 μl 以上入れない
15 ml チューブに 2 ml 以上入れない

Bioruptor™で断片化

[30 秒間 "ON" / 30 秒間 "OFF"] で 10サイクル

遠心(5 分間、14,000 ×g、室温)

上清(断片化クロマチン)

10 μl
コントロール
(解析ステップへ)

残り
ChIP 及び インプットサンプル用

ステップ 3へ

1 IP あたり 10 μl の断片化クロマチンを使用
75 μl(6 IP用)、150 μl(12 IP用)
すぐに使用しない場合は凍結チューブに分注し
液体窒素で瞬間凍結 -80 で保存

ステップ 3 免疫セレクションと免疫沈降

< ブレクリアと免疫セレクション >

IPインキュベーションミックスを準備する
(1ChIPあたり、P.I. 4 μl、Buffer B 20 μl、H₂O 76 μl)

IPインキュベーションミックス 90 μl を 1.5 ml チューブに入れる
(1 ChIPアクセシに 1チューブ)

断片化クロマチン 10 μl 添加

希釈した断片化クロマチン 10 μl を
インプットサンプル用にキープ

pre-blocked protein A coated beads 20 μl 添加

ローテーターでインキュベート(60分間、4)
(サンプルブレクリア)

遠心(2分間、500 ×g、4)

上清

100 μl を新しい 1.5 ml チューブに移す

抗ヒストン抗体添加

antibody anti-histone H3[K4me3]
(キットに添付) 1 μl (0.5 μg)
その他の抗体 0.5 ~ 2 μg

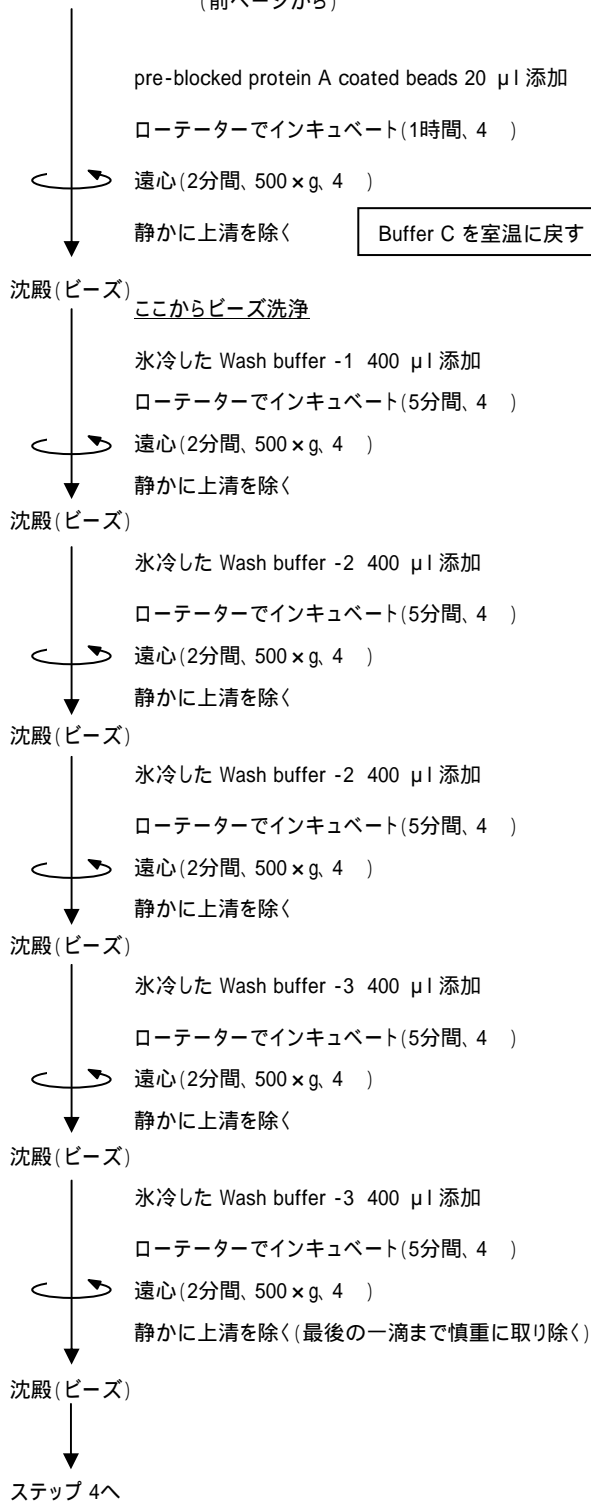
数回転倒混和

ローテーターでインキュベート(一晚、4)

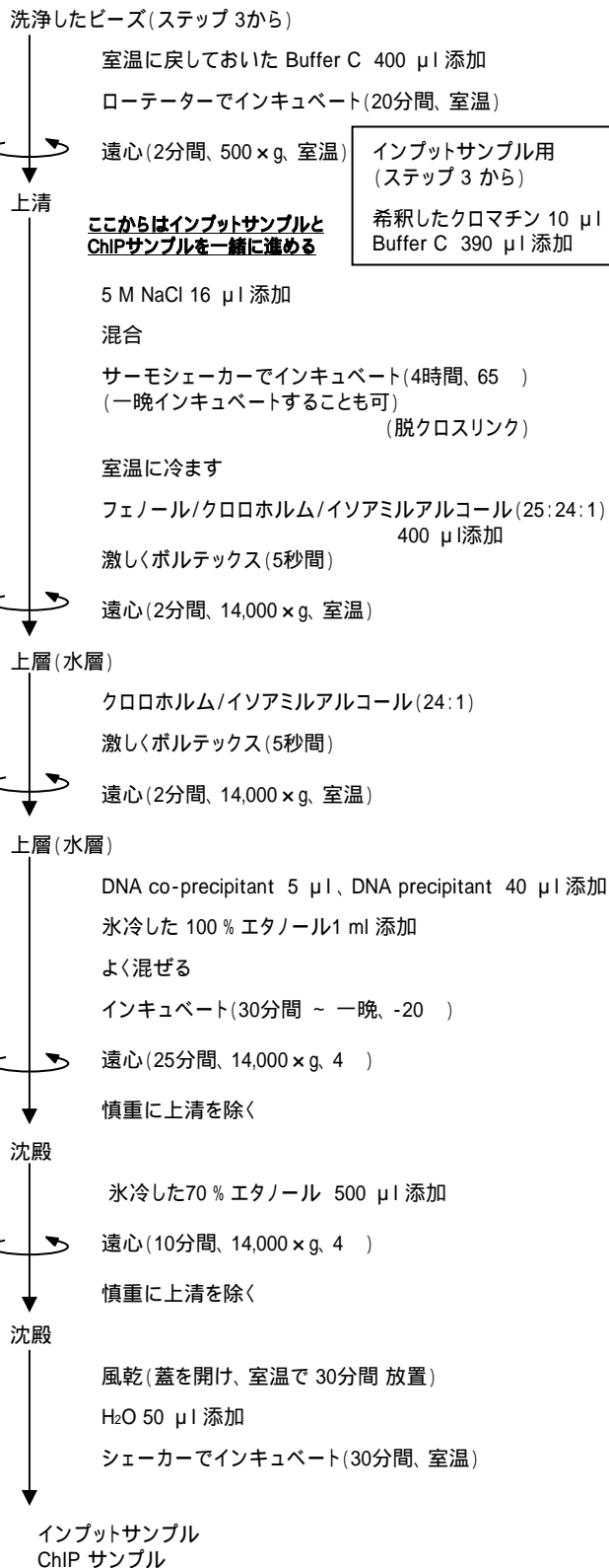
免疫沈降(次ページ)へ

< 免疫沈降、ビーズの洗浄 >

[プレクリアした断片化クロマチン - 抗体]
(前ページから)



ステップ 4 DNA精製



ステップ 5 定量PCR

定量PCRの詳細はInstruction Manualを参照

反応液 (1反応)

バッファーマックス	12.5 μ l
Primer pair	2.0 μ l
H ₂ O	5.5 μ l
DNAサンプル	5 μ l
トータル量	25 μ l

サイクル条件

95	3分間	} \times 40サイクル
95	15秒間	
60	45秒間	

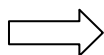
検出

SYBR Green

解析ステップ 断片化したクロマチンの解析

解析ステップについてはInstruction Manualを参照

お問い合わせ：
株式会社ニッポンジーン 研究試薬部
930-0834 富山県富山市同屋町1-8-7
TEL：076-451-6548 FAX：076-451-5647
E-mail：info@nippongene.com



データ解析へ