



Diagenode sa
CHU, Tour OGA B34, 3^e étage
Avenue de l'Hôpital, 1
4000 Liège - Belgium

C.A. Kit

In vitro Chromatin Assembly Kit

NIPPON GENE Code No.314-80871
(Diagenode Catalog #: ca-vitro-001)

Instruction Manual(version 01)
(日本語訳 第1版)

このマニュアルは、Diagenode 社の C.A. Kit に添付されている Instruction Manual を、ニッポンジーンで翻訳したものです。

キット内容は予告なく変更される可能性があります。キット開封後は必ず内容をご確認下さい。

本品は試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。
また、試薬についての基本的な知識のある方以外は取り扱いわないでください。

株式会社ニッポンジーン

内容		ページ
1.	はじめに	3
2.	キットの概要	5
	C.A. kit: プロトコールとタイムテーブル	6
3.	キットの構成	7
	キット内容	7
	本品以外に必要な試薬・消耗品・装置	7
	キットモジュール	8
4.	キットのアッセイプロトコール	9
	スターティングマテリアル:	9
	DNA 精製 (DNA module for C.A.)	9
	In vitro Chromatin Assembly (C.A.):	12
	ステップ 1- C.A. titration	12
	ステップ 2- C.A. 解析 (MNase 消化)	15
	ステップ 3- 最終的な至適化された C.A. (最良の titer を用いる)	20
	ステップ 4- 形成されたクロマチンの精製	20
5.	追加プロトコール: C.A. アプリケーションと結果	23
6.	トラブルシューティングガイド	26
7.	参考資料	28
8.	お問い合わせ	28

1. はじめに

真核生物の DNA は、クロマチンにパッケージされており、このクロマチンの最小単位であるヌクレオソームは、コアヒストン八量体のまわりを 147 bp の DNA が約二回巻き付いてできています。八量体はそれぞれ 4 種類のコアヒストンタンパク質 H2A、H2B、H3、H4 の 2 コピーから構成されています (Wolffe, 1998)。クロマチンは、DNA の凝縮のような構造に関連した機能のほかにも、転写を含む様々な DNA 代謝の局面も調節しています。これはクロマチンが動的な状態で存在しているため可能になります (Loyal et al., 2003a)。

細胞のクロマチン構造は、細胞の代謝要求に応じて急速に変化することができます。これらの変化は、**遺伝子発現に直接影響を与えるため**、DNA が関わる生化学反応を研究する際には、クロマチンの状況を考慮しなければなりません。DNA 結合因子はクロマチンに含まれます。そのため、DNA が直接作用する分子メカニズムは、裸の DNA よりもクロマチンで研究することが望ましいと言えます (Lusser and Kadonaga, 2004)。このため、DNA とヒストンをクロマチンに再構築する必要があります。ここに、私たちは *in vitro* でクロマチンを再構築するための新しいキットを紹介します。

過去数十年の間、*in vitro* でのクロマチンを形成する方法がいくつか報告されてきました。そのうちのいくつかは、ヒストン八量体を DNA に沈着させる化合物を使用しています。他の方法は、クロマチンを形成する能力を持つ、細胞のタンパク質複合体を利用しています。これらの複合体のいくつかは、同定され精製されました (Loyal et al., 2003b)。さまざまなヒストンシャペロンが同定され、その役割はヒストンタンパク質を DNA に導くことです。さらにいくつかクロマチン形成因子が同定され、これらは一般的に複数のタンパク質から構成されています (Leroy et al., 1998)。

remodeling and spacing factor (RSF) は ATP 依存性のヌクレオソームリモデリング活性とスペーシング活性を持ちます (Leroy et al., 1998)。**nucleosome assembly protein 1 (NAP-1)** はヒストンシャペロンです。RSF も NAP-1 も、*in vitro* でクロマチンを再構築するのに用いられます (キットの概要とプロトコル参照)。以前に報告された技術 (例: 塩透析法、ポリグルタミン酸処理、ショウジョウバエやアフリカツメガエルの抽出物の使用) に対して、RSF を介したクロマチン形成反応の利点は、高度に規定されたシステムで、スペースが調節されたクロマチンが形成されることです。

in vitro のクロマチン形成反応における DNA とコアヒストンの比は重要で、新しい DNA とヒストンを調製するごとに **titration** する必要があります。比が正しくなかったら、クロマチンの形成は失敗するでしょう (キットプロトコルのステップ 1 参照)。

クロマチン形成反応の効率は、micrococcal nuclease (MNase) による部分的な消化や電子顕微鏡検査により評価できます (キットプロトコルのステップ 2 と結果のセクション参照)。

In vitro chromatin assembly は DNA 代謝における調節の役割を果たすわずかなクロマチンの変化を読み取るために使用できます (Loyal et al., 2003b)。組み換えクロマチンの再構築は、クロマチン形成反応や転写における異なるヒストン修飾の役割を直接研究することができます (Loyal et al., 2001)。

Diagenode 社の新しい C.A. Kit は *in vitro* Chromatin Assembly (C.A.) と C.A. 解析を行うためにデザインされています。形成されたクロマチンは精製され、*in vitro* 解析に用いられます。

この新しい *in vitro* Chromatin Assembly の方法は、あなたの DNA サンプルと並行して使えるコントロールを提供します。C.A. titration 最適化プロトコールは、最適な *in vitro* C.A. のために、**最良のタンパク質と DNA の比**を用いて操作できるようになっています。

このキットにおける 4 つの重要な C.A. のステップを紹介します：

ステップ 1/

C.A. 実験の 品質 のコントロールのために、まず titration ステップを行います。

ステップ 2/

C.A. 反応の 効率 のコントロールのため、MNase 消化を行います。

ステップ 3/

C.A. 実験の計画を立ててから、“最終的な”至適化された C.A. を行います。

ステップ 4/

それから、*in vitro* で形成されたクロマチンを精製します。

これらのステップは 信頼性があり、矛盾のない結果のための三つの重要な鍵となります。

このマニュアルの次の数ページに、キットの概要、キットの構成及び詳細なキットプロトコールがあります。トラブルシューティングガイドと追加プロトコールはマニュアルの最後にあります。

2. キットの概要

In vitro C.A.

ヒストン
+ RSF + NAP-1
+ 10 × complete ATP mix
+ バッファー

+ DNA
(コントロールまたは
サンプル)

RSF: ヒト、組み換え体
(バキュロウイルス)

NAP-1: マウス、組み換え体
(バキュロウイルス)

ヒストン: ネイティブな ヒストン
八量体 (HeLa 細胞)

1. C.A. titration (ヒストンとDNAサンプル)

2. MNaseによるC.A.の解析

アガロースゲル

3. C.A. (最良のtiterを用いる)

4. 精製

in vitro アプリケーション

ChIP

転写

電子顕微鏡検査

Diagenode 社の C.A. Kit は *in vitro* Chromatin Assembly (C.A.)用にデザインされている。

本品には、C.A. titrationとC.A.解析を含めた、Chromatin Assembly解析(C.A.)20回分を行うのに十分な試薬が入っています。各C.A.解析には2µgのDNAが必要です。C.A. titration(ステップ1)とC.A.解析(ステップ2)を行うのに最適化されたバッファーとプロトコールが提供されています。最初の二つのステップは、あなたのDNAサンプルを用いるC.A.のための、最良のタンパク質とDNAの比を決定するために行われます。それから、ステップ3では、最適化されたC.A.反応が繰り返されます。最後に、形成されたクロマチンが精製されます(ステップ4)。プロトコールにはC.A.精製(ステップ4)と*in vitro* ChIP、転写、電子顕微鏡検査(E.M.)のような*in vitro*解析の方法も提供されています。

C.A.に用いるDNAを精製するための3種類のバッファーが入ったモジュールを提供しています(DNA module for C.A.、下記キットの内容とプロトコール参照)。

C.A. Kit : プロトコルステップとタイムテーブル

C.A. Kit には DNA サンプルを調製するための追加のモジュールがあります。キットとモジュールには適切なバッファと詳細なプロトコルが提供されています。

はじめに、C.A.用のDNAを調製する：

表 1a

DNA MODULE for C.A.		日程	所要時間
-	-	-	数日間

DNA module for C.A.は、クロマチン形成用の DNA を調製するための至適化されたプロトコルと 3 種類のバッファから構成されています。

C.A.のためのDNA調製には数日かかります。手間はかかりますが、塩化セシウムで精製したDNAを使用することを強くお勧めします。迅速な方法でDNAサンプルを調製することもできますが、DNAの質は低下し、C.A.の効率に影響を与えるでしょう（例：キットで精製したプラスミドは良くないクロマチン形成を示す）。

Chromatin Assembly (C.A.) に進む：

表 1b

Chromatin Assembly (C.A.) Kit		日程	所要時間
ステップ 1	Titration	1 日目	1 時間 + 一晚インキュベーション
ステップ 2	MNase 解析	2 日目	数時間作業する。
ステップ 3	C.A. (最良の titer を用いる)	2 日目	1 時間 + 一晚インキュベーション
ステップ 4	形成したクロマチンの精製	3 日目	約 2 時間

C.A. Kit には、必要なタンパク質と DNA コントロールが入っています。C.A.は、本キットの試薬、バッファ、プロトコルの使用により、信頼性のある結果を得るために至適化されています。C.A.の質と効率は、最初の C.A. titration と C.A.反応の後の MNase 消化を行うことによって最適化されます（それぞれステップ 1 と 2）。

C.A. titration は 1 日目の約 1 時間とそれに続く一晚のインキュベーションで行われます（ステップ 1）。2 日目の初め、C.A.を解析します（ステップ 2）。次に、2 日目の終わりに最良の titer（ヒストン：DNA の比）を用いて“最終的な” C.A.が行われます（ステップ 3）。さらに、3 日目に行われる重要な精製ステップがあります（ステップ 4）。形成されたクロマチンの精製は、研究者に保証された品質の *in vitro* 解析の結果をもたらします（プロトコルのアプリケーションセクション、結果、参考資料参照）。

構成：1 キットあたり、C.A.反応 20 回分（DNA 2 µg/反応）

3. キットの構成

キット内容

本品には、C.A. titration から C.A. 解析までの、**Chromatin Assembly 解析** (C.A.) 20 回分の試薬が入っています (C.A. Kit : Diagenode 社 catalog # ca-vitro-001)。C.A. 解析 1 回あたり、2 μ g の DNA が必要です。C.A. 用の DNA を精製するためのバッファーは、別に用意されています。

下記 (表 2a) 参照 (DNA Module for C.A. : Diagenode 社 catalog # ca-vitro-002)。

キットとモジュールの内容は表 2 を参照してください。

製品到着後、各試薬は下記に示す通りに分けて保存してください。

いくつかの試薬は表 2 に示すように、分注して - 80 で保存する必要があります。

本品以外に必要な試薬・消耗品・装置

試薬・消耗品

- ・ラボ用手袋 (全ての操作で着用)
- ・オートクレーブしたチップ
- ・RNase/DNase-free の 1.5 ml チューブ (シリコナイズチューブの使用は任意)
- ・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%
- ・アガロース及び TBE バッファー
- ・DNA 分子量マーカー (例 123 bp ladder)
- ・6 \times ローディングバッファー
- ・エチジウムブロマイド入りウォーターバス (1 μ g/ml)

装置

- ・冷却遠心機 (1.5 ml チューブ用)
- ・遠心機 (15 ml チューブ及び 50 ml チューブ用)
- ・ドラフト
- ・ボルテックス
- ・ウォーターバス (30、37)
- ・アガロースゲル電気泳動装置

製品到着後、各試薬は下記に示す通りに分けて保存してください。

表 2a : (Diagenode社 catalog # : ca-vitro-002)

DNA Module for C.A.			
内容	コメント	容量	保存
Buffer 1	イオンキレート剤が含まれます。	50 ml	4
Buffer 2	界面活性剤が含まれます。	150 ml	室温
Buffer 3	酸が含まれます。	100 ml	室温

表 2b : (Diagenode社 catalog # : ca-vitro-001)

Chromatin Assembly (C.A.) Kit			
内容	コメント	容量	保存
Histones	<u>5本のチューブに分注する。</u> (14µl/チューブ)	75 µl	- 80
Blocker	5 mg/ml	120 µl	- 20
RSF and NAP-1	<u>5本のチューブに分注する。</u> (16µl/チューブ)	90 µl	- 80
Buffer A	塩とイオンキレート剤が含まれます。	6 ml	- 20
Buffer B	塩が含まれます。	500 µl	室温
10×ATP Mix-1	塩が含まれます。	330 µl	- 20
10×ATP Mix-2	-	60 µl	- 20
10×ATP Mix-3	塩が含まれます。	40 µl	- 80
DNA Control	0.2 µg/ µl	60 µl	- 20
MNase	100 mU/ µl	30 µl	- 80
Buffer C	MNase 開始バッファー	150 µl	室温
Proteinase K	20 mg/ml	30 µl	- 20
Buffer D	MNase 停止バッファー	6 ml	室温
Co-precipitant	-	75 µl	-20
Precipitant	-	600 µl	室温

4. キットのアッセイプロトコール

Diagenode 社の C.A. Kit は in vitro Chromatin Assembly 用である。

スターティングマテリアル

C.A. 解析 1 回あたり、2 μ g の DNA が必要である ; スケールは調整する。

C.A の前に:

まず、DNA サンプルを下記に示すように精製する。

Diagenode 社の DNA module for C.A. は、C.A. に用いるために必要な DNA を精製する、至適化されたプロトコールと 3 種類のバッファーを提供する。本品以外に必要な追加の試薬リストと必要な装置のリストは下に示す。

DNA の精製方法は、塩化セシウム-エチジウムブロマイド平衡密度勾配遠心法による closed circular DNA の精製である。

本品以外に必要な試薬・消耗品・装置

試薬

- ・ラボ用手袋 (全ての操作で着用)
- ・オートクレーブしたチップ
- ・下記のプロトコールに示したボトル及びチューブ
- ・培地、抗生物質
- ・イソプロパノール
- ・酢酸アンモニウム
- ・TE
- ・塩化セシウム
- ・エチジウムブロマイド
- ・イソアミルアルコール
- ・水
- ・エタノール 70%
- ・19 ゲージの注射針

装置

- ・超遠心機及び遠心機 (下記プロトコール参照)
- ・ドラフト

プロトコール

1. プレートからシングルコロニーを採取し、適切な**抗生物質**を含んだ 50 ml の LB 培地が入ったフラスコ (250 ml 容) に接種する。**前培養液**を 37 で一晩、激しく振とう培養する。
2. 10 ml の前培養液を、適切な抗生物質を含んだ 1 L の LB 培地が入った三角フラスコ (4 L 容) に接種する。**培養液**を 37 で一晩、激しく振とう培養する (トータルで 2~10 L で操作する)。
3. 培養液を 4 で 4,000 rpm、30 分間遠心する (例: Beckman 遠心機 J-6B)。上清を注意深く捨て、培地を完全に除くため、ボトルをペーパータオルの上に逆さにして置く。
4. **培養液 1 L あたり 20 ml の Buffer 1** を沈殿に添加する。細胞塊がなくなるまで激しくボルテックスすることにより、沈殿を完全に再懸濁する。
5. **培養液 1 L あたり 60 ml の Buffer 2** を添加して、4~6 回転倒させることにより穏やかに混合し、氷上で 5 分間インキュベートする。ゲノム DNA の断片化を避けるため、ボルテックスは行わない。このときライセートは粘性があるようにみえる。
6. **培養液 1 L あたり 45 ml の Buffer 3** を添加し、直ちに 4~6 回転倒させることにより穏やかに混合し、氷上で 30 分から 1 時間インキュベートする。
7. 11,000 rpm、60 分間遠心する (例: 250 ml 容 GSA ボトル)。新しいボトルに DNA を含む上清を回収する。
8. **培養液 1 L あたり 125 ml のイソプロパノール**を添加して、二本鎖 DNA を沈殿させる。ボルテックスして混合し、室温に 5 分間放置する。
9. 4 で 10,000 rpm、30 分間遠心する。上清を注意深くデカントする (イソプロパノール沈殿でできる沈殿は透明なので、見えにくいかもしれない)。溶液を全て除くため、ボトルをペーパータオルの上に逆さにして置く。
10. **培養液 1 L あたり 10 ml の 2 M 酢酸アンモニウム**で沈殿を再懸濁し、氷上で 5 分間放置する (RNA、タンパク質等が除去される)。7,000 rpm、15 分間遠心する。上清を新しい 50 ml 容 チューブに移す。
11. 上清に等量の**イソプロパノール**を添加する。10,000 rpm、20 分間遠心する。沈殿を氷冷した 70% エタノールで洗浄し、20,000 × *g*、15 分間遠心する。沈殿を乾燥させる。
12. **培養液 1 L あたり 8 ml の 1×TE** で沈殿を再懸濁し、**8.8 g の塩化セシウム**を添加する。塩化セシウムが溶解したら、10 mg/ml のエチジウムブロマイドを 0.3 ml 添加して完全に溶解させる。塩化セシウムが DNA 懸濁液に溶けるには少し時間がかかる。

13. 懸濁液を遠心チューブ（例：Beckman Optiseal™ polyallomer、26×77 mm、32.4 ml）に入れる。DNA と塩化セシウムの懸濁液をチューブいっぱい満たし、チューブの中に空気が入らないようにして、チューブキャップでチューブを密閉する。

** 注意：エチジウムブロマイドは強力な突然変異誘起剤で、弱い毒性があります。この色素を含む溶液を扱うときは、手袋を着用してください。

14. チューブの重さを量り、バランスを 0.02 g 以内に合わせ、チューブをローター（例：70.1 Ti rotor）に入れる。遠心チューブの上にアダプターを置くことを忘れないようにする。

15. 20 で 53,000 rpm、18 時間以上遠心する。

** DNA の 2 本のバンドが勾配の真ん中にあり、通常の光で見えるはずである。上のバンドはたいがい量が少なく nicked/relaxed circular プラスミド DNA からなる；下のバンドは closed circular プラスミド DNA からなる。チューブの底にある濃い赤の沈殿はエチジウムブロマイドと RNA の複合体からなる。

16. 19 ゲージの注射針を使って最小の量（通常約 1 ml）で DNA のバンドを回収する。サンプルを吸い取る前に、空気を入れるためにチューブの蓋を取る。

** エチジウムブロマイドはイソアミルアルコールで DNA から除去される（下記参照）。

17. イソアミルアルコールと水が 1 : 1 の溶液を準備し、上相を回収する。

18. DNA サンプルに等量の飽和させたイソアミルアルコールを添加し、ボルテックスにより二つの相を混合して 5,000 rpm で 2 分間遠心する。上の相（ピンク）をデカントし、下の相をキープする。

19. ピンク色が完全に抜けるまで、4~5 回抽出を繰り返す。

20. 下の相をきれいなチューブに移す（容量を測定する。1×V）。3 倍量の 1×TE を加え、混合する。最終容量は 4×V である。

21. DNA 懸濁液に最終容量（4×V）と等量のイソプロパノールを添加し、8,000 rpm、20 分間遠心する。

21. DNA の沈殿を 70% エタノールで洗浄する。室温で沈殿を乾燥させる。

22. DNA を 1 ml の 1×TE に溶解し、DNA 濃度を測定する。

23. DNA は -20 で保存する。

培養液 1 L あたり 1~2 mg の DNA 収量が期待される。

In vitro Chromatin Assembly (C.A.)

DNA はコントロールを含む C.A. 反応、titration (ステップ 1) と形成されたクロマチンの解析 (ステップ 2) に使われる。最適な C.A. 条件で形成クロマチンを作る反応が再び行われ (ステップ 3)、精製される (ステップ 4)。

ステップ 1: Chromatin Assembly titration (最良のヒストンと DNA の比を決定するために)
コントロールを含む C.A. 条件の最適化

ステップ 2: Chromatin Assembly 解析
MNase 消化

ステップ 3: Chromatin Assembly (最良のヒストンと DNA の比を用いる)
あなたの DNA サンプルを使った“最終的な”至適化された C.A. 反応

ステップ 4: 形成されたクロマチンの精製

ステップ 1: Chromatin Assembly titration

C.A. 条件概要

* C.A. インキュベーションミックスは、ヒストン、RSF、NAP-1、DNA、ATP ミックスを含むバッファーからなる (下の表 3 参照)。

表 3: C.A. インキュベーションミックス成分概要

#	試薬	容量	コメント
1	Buffer A	110.10 μ l	[150.00 - X] μ l X は試薬# 2 から# 7 のトータル容量 最終的な容量が 150.00 μ l になるように Buffer A を添加。
2	10 \times complete ATP mix	15.00 μ l	
3	Histones	2.00 μ l	あなたの DNA サンプルを titration するときが変わる。 (表 5 参照)
4	Blocker	3.00 μ l	
5	RSF and NAP-1	3.50 μ l	ネガティブコントロールには入れない。
6	Buffer B	6.40 μ l	
7	DNA	10.00 μ l	1 反応あたり 2 μ g の DNA を使用 (2 μ g/10 μ l) ポジティブコントロールはキットの DNA を入れる。 ポジティブコントロールの次に あなたのサンプルを使用する。
	トータル容量	150.00 μ l	

ステップ 1 のクイックチャートが下に、詳細なプロトコールは次のページ以降にある。

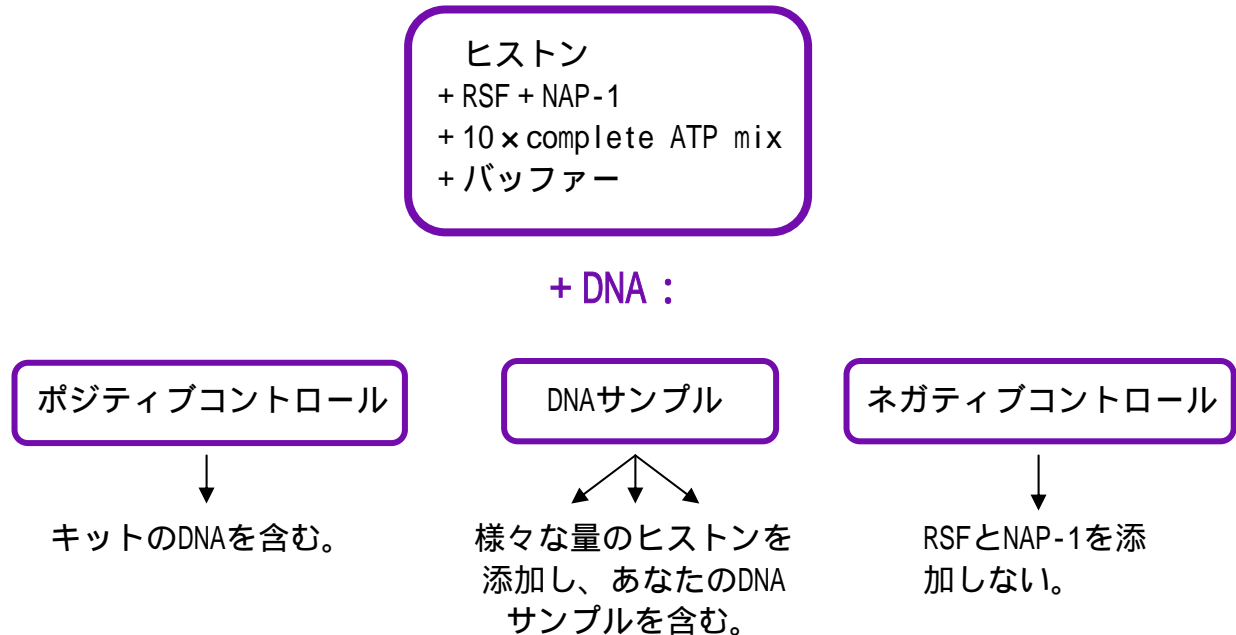
* 始めに、10×complete ATP mix を調製する (表 4)。

* それから、C.A. titration ステップに進む (1 回の反応で、3 種類の量のヒストンを使用する) (表 5)。

* 実験にはポジティブコントロールとネガティブコントロールを含む (表 5)。

クイックチャート : ステップ 1

in vitro Chromatin Assembly titration



1 回の解析を行うための反応数について注意する :

- ❖ キットのコントロール : ネガティブな C.A. 反応コントロールとキットの DNA を使ったポジティブコントロールを使用すると、2 反応行う。
- ❖ Titration : キットのコントロール (ポジティブとネガティブ) と一緒にあなたのサンプルの C.A. titration をテストすると、5 反応行う。
- ❖ 最終的な C.A. : 最良の条件 (titration により決定した) で、2 連でクロマチン形成を行うので、2 反応行う。

はじめに、10×complete ATP Mix を調製する。

- 次の表 4 に記載されている試薬を氷上で溶かす。10×complete ATP Mix を調製するために表 4 に記載されている試薬を、新しい 1.5 ml チューブに一つずつ添加する。
 - ❖ 各 C.A. 反応ごとに新鮮な complete バッファーを使用することを勧める。一日に必要な量を調製し、使用しなかった分は捨てる。
 - ❖ または、過剰量のバッファーを調製し、分注して -80 で凍結させることもできる。凍結融解は避ける。

表 4 : 10×complete ATP Mix

	1 反応	2 反応 + 10% 過剰量	5 反応 + 10% 過剰量
10×ATP Mix-1	9.00 µl	19.80 µl	49.50 µl
10×ATP Mix-2	1.50 µl	3.30 µl	8.25 µl
10×ATP Mix-3	1.00 µl	2.20 µl	5.50 µl
Buffer A	3.50 µl	7.70 µl	19.25 µl
トータル容量	15.00 µl	33.00 µl	82.50 µl

- チューブをタッピングして混合する。使用するまで氷上に置いておく。

C.A. titration を行う。

- 次の表 5 に記載されている試薬を氷上で溶かす。

表 5 : C.A. titration 実験

C.A. Mix	ポジティブコントロール	DNA サンプル (ヒストン低)	DNA サンプル (ヒストン中)	DNA サンプル (ヒストン高)	ネガティブコントロール
Buffer A	110.10 µl	110.50 µl	110.30 µl	110.10 µl	113.60 µl
10×Complete ATP Mix	15.00 µl	15.00 µl	15.00 µl	15.00 µl	15.00 µl
Histones	2.00 µl (1.80 µg)	1.60 µl (1.44 µg)	1.80 µl (1.62 µg)	2.00 µl (1.80 µg)	2.00 µl
Blocker	3.00 µl	3.00 µl	3.00 µl	3.00 µl	3.00 µl
RSF + NAP-1	3.50 µl	3.50 µl	3.50 µl	3.50 µl	-
Buffer B	6.40 µl	6.40 µl	6.40 µl	6.40 µl	6.40 µl
DNA	10.00 µl キットの DNA	10.00 µl	10.00 µl	10.00 µl	10.00 µl
トータル容量	150.00 µl	150.00 µl	150.00 µl	150.00 µl	150.00 µl

- 1.5 ml チューブにラベルする。以下のように、5 反応分のラベルをする。
 - ❖ #1 : ポジティブコントロール。
 - ❖ #2 : DNA サンプルと少量のヒストンコア
 - ❖ #3 : DNA サンプルと中間量のヒストンコア
 - ❖ #4 : DNA サンプルと多量のヒストンコア
 - ❖ #5 : ネガティブコントロール

5. 上の表 5 に記載されている試薬を、ラベルした 1.5 ml チューブに一つずつ添加する。まず、DNA 以外の全ての試薬を添加して、チューブを穏やかにタッピングして混合し、それから DNA を添加してチューブをタッピングして再度混合する。
 - ❖ 新しい試薬を添加するたびに、溶液に直接添加してピペティングして混合する。
 - ❖ 新しい試薬をチューブに添加するたびにチップを取り替える。
 - ❖ 全ての試薬は氷上に置いておく。
 - ❖ サンプルは室温に置いておく（室温、実験台の上）。
6. スピンダウンする：500 × g (3,000 rpm)、10 秒間。
7. 30 のウォーターバスで一晩インキュベートする。
 - ❖ より短いインキュベーション時間にする 것도可能だが、6 時間以下にはできない。そのため、一晩のインキュベーションを強く勧める。

ステップ 2: Chromatin Assembly 解析

MNase 消化

8. MNase と Proteinase K を氷上で溶かす。
Buffer A と Buffer C も同様に氷上に置いておく。
Buffer D は使用前に温める（37 でしばらくの間）。
9. 2 本の新しい 1.5 ml チューブにラベルする（“a” と “b”）。次のように MNase を希釈する：
 - ❖ “a” はキット添付の MNase ストック溶液を 40 倍希釈する。
 - ❖ “b” はキット添付の MNase ストック溶液を 20 倍希釈する。
 - ❖ その日に必要な量の希釈した MNase を調製する。スケールは調整する（下の表 6、表 7 を参照）。C.A. 1 反応、2 反応、5 反応分の容量を示す。
 - ❖ 使用するまで氷上に置いておく。

表 6：希釈した MNase “a”

	1 反応	2 反応 + 10% 過剰量	5 反応 + 10% 過剰量
MNase ストック	0.25 μl	0.55 μl	1.37 μl
Buffer A	9.75 μl	21.45 μl	53.63 μl
トータル容量	10.00 μl	22.00 μl	55.00 μl

表 7：希釈した MNase “b”

	1 反応	2 反応 + 10% 過剰量	5 反応 + 10% 過剰量
MNase ストック	0.50 μl	1.10 μl	2.75 μl
Buffer A	9.50 μl	20.90 μl	52.25 μl
トータル容量	10.00 μl	22.00 μl	55.00 μl

10. 新しい 1.5 ml チューブをラベルする（上のポイント 4 で使ったチューブと同じ本数）。
 - ❖ 同じ番号を使用する。上のポイント 4 で使った番号を書いたあと、“b” の文字を追加する。
 - ❖ #1b、#2b、#3b、#4b、#5b。

11. 30 のウォーターバスから C.A. サンプルを取り出す (ポイント 7より)。
12. チューブから、対応する新しく“b”とラベルしたチューブに 75 μ l の C.A. 反応液を移す：
例：#1b、#2b、#3b、#4b、#5b (ポイント 10で準備した)。元のチューブの残り半分の反応液は残す (例：#1、#2、#3、#4、#5)。
13. チューブに希釈した MNase “a”または“b”を 10 μ l 添加する。チューブを穏やかにタッピングして混合する。
 ❖ ラベルしたチューブに MNase “a”を添加する：例：#1 から#5。下の表 8 参照。
 ❖ ラベルしたチューブに MNase “b”を添加する：例：#1b から#5b。下の表 8 参照。
 ❖ チューブを室温に置いておく (実験台の上)。
14. サンプルと Buffer C とタイマーを持って、30 のウォーターバスの所に行く。
 ❖ ピペットとチップも必要である。
15. タイマーを 10 分にセットする。各チューブに 10 秒ごとに 2.3 μ l の Buffer C を添加する。チューブを穏やかにタッピングして混合する。
 ❖ チューブを並べて、正確な順番でチューブにバッファーを添加する：最初から最後のチューブまで (例：チューブ#1 から#5、それから#1b から#5b)。
 ❖ 正確なタイミングが重要である。
 ❖ もしそのほうが良ければ、20 秒間隔に固定する (間隔が一定である限り)。
 ❖ これで酵素反応がスタートする。

表 8 : MNase 反応 (形成したクロマチンの消化)

	MNase “a”	MNase “b”
C.A. 反応液 (ポイント 7)	75.00 μ l	75.00 μ l
希釈した MNase (ポイント 9)	10.00 μ l	10.00 μ l
Buffer C	2.30 μ l	2.30 μ l
トータル容量	87.30 μ l	87.30 μ l

16. 全てのチューブを 30 で正確に 10 分間インキュベートする。
17. それから、ウォーターバスの隣で、再び 10 秒ごとに 88 μ l の Buffer D を各チューブに添加する。チューブを穏やかにタッピングして混合する。
 ❖ 上と同じチューブから始める：例、最初から最後のチューブ (チューブ#1 から#5、それから#1b から#5b)。
 ❖ 各チューブにバッファーを添加するときに、チューブの壁に触らない限りチップを換える必要はない。
 ❖ 正確なタイミングが重要である。
 ❖ もしそのほうが良ければ、20 秒間隔に固定する (ポイント 5 と同じ間隔で行う)。
 ❖ これで酵素反応が停止する。

18. 各チューブに 1 μ l の Proteinase K を添加する。
 - ❖ プロテアーゼは直接サンプルに添加し、数回ピペティングして混合する。
 - ❖ 蓋をしめて、穏やかにタッピングして混合する。
 - ❖ サンプルチューブごとに新しいチップを使用する。
 - ❖ Proteinase K を添加している間、全てのチューブは室温に置いておく（実験台の上）。
19. 37 のウォーターバスで 30 分間インキュベートする。
 - ❖ インキュベートは 1 時間まで延ばせるが、必須ではない。

DNA 抽出

20. チューブに 176 μ l（等量）のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを添加する。
 - ❖ ドラフトで操作する。
21. 30 秒間激しくボルテックスする。
22. 室温で、14,000 \times g（12,000 rpm または最大スピード）、5 分間遠心する。
23. その間に、co-precipitant と precipitant を氷上に置く。新しい 1.5 ml チューブにラベルする。
 - ❖ 例：チューブ#1 から#5 と#1b から#5b。
24. ラベルした新しいチューブに 1 μ l の co-precipitant を添加し、それから各チューブに 10 μ l の precipitant を添加する。
25. 遠心（ポイント 22）の後、上の相を新しいチューブ（ポイント 24）に移す。穏やかにタッピングして混合する。ドラフトで操作する。
26. チューブに 600 μ l の 100% エタノールを添加する。
27. - 80 で 30 分間インキュベートする。
28. その間に、1.3% アガロースゲルを準備する。新鮮な TBE バッファーを使用する。
 - ❖ 新鮮な試薬を使うことが重要である。
 - ❖ 13 cm（から 20 cm の長さ）のゲルの使用を勧める。
29. 4 で、14,000 \times g（12,000 rpm または最大スピード）、10 分間遠心する。
30. 上清を捨てる。沈殿をキープする。
31. 各沈殿に 600 μ l の 70% エタノールを添加する。
32. 4 で、14,000 \times g（12,000 rpm または最大スピード）、10 分間遠心する。
33. 上清を捨てる。しばらくの間、室温で沈殿を風乾させる。

34. 沈殿に 10 μ l の水を添加する。
 - ❖ これで C.A. サンプルから DNA が精製された。
35. 各チューブに 2 μ l の 6 \times ローディングバッファーを添加する。穏やかにタッピングして混合する。
 - ❖ 全ての DNA サンプルは解析に用いられる。
36. 室温で、約 3,000 rpm で 30 秒間遠心する。

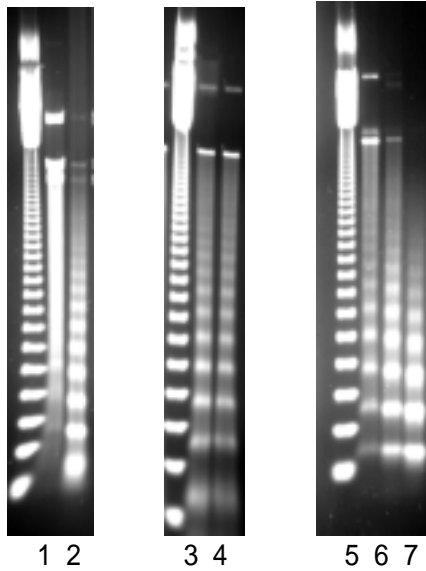
アガロースゲルでの DNA 解析

37. 1.3% アガロースゲルの両側に分子量マーカーをのせる (例: 123bp ラダー)。
38. ゲルに DNA サンプルをのせる。
39. 室温、150V で泳動する。青い色素がゲルの下から 2~3 cm のところまで流れたら、泳動を止める (私たちの条件では、約 2 時間かかる)。
40. エチジウムブロマイド入りのウォーターバスで 30 分間インキュベートして DNA を染色する。
41. アガロースゲルを水でさらに 30 分間から 1 時間インキュベートして脱色する。
42. UV ランプ下で、ゲルの写真を撮る (下記の図 1 及び図 2 参照)。

C.A. titration の解析: 予想と次に行うこと

43. ゲルで消化を解析する。以下に C.A. 解析に関する例として、いくつかの主要なコメントとゲルの写真を示す。
 - ❖ C.A と消化が両方とも良好であれば、次のステップに進む。
 - ❖ C.A. は良好だが、クロマチンが過剰に消化されている。
もし、クロマチンが過剰に消化されているなら、低いバンドが強く見えるので、新しく C.A. を行いより少量の MNase でサンプルを消化する: 25.00 と 50.00 mU /消化 (それぞれ“a”と“b”、ポイント 9) の代わりに 10.00 と 25.00 mU /消化。
 - ❖ 条件に満足しなかったら、ヒストンの量を低い範囲か高い範囲にして再度 titration を行う (結果による)。トラブルシューティングガイド参照。
44. 最良の形成されたクロマチンになるタンパク質の量を選んで、ステップ 3 の最後の Chromatin Assembly に進む。
 - ❖ 塩化セシウムで精製した DNA と C.A. Kit に入っている試薬を使うことを強く勧める。また、“最終的な”C.A. 実験を始める前に、プロトコールで示しているようにコントロールを含めることと C.A. titration (ステップ 1) を行うことは、とても重要である。最後の至適化された C.A. (ステップ 3) は最良のタンパク質と DNA の比 (ステップ 2 で決定された) で行われ、精製され、*in vitro* 解析に使われる (ステップ 4)。

図 1.



ヒストンコアと組み換えタンパク質の RSF/NAP-1 で形成されたコントロール DNA の Micrococcal nuclease 消化解析。塩化セシウム精製した DNA を C.A. 解析に用いた。

左のパネル (C.A. Kit に入っている MNase を使用した) :

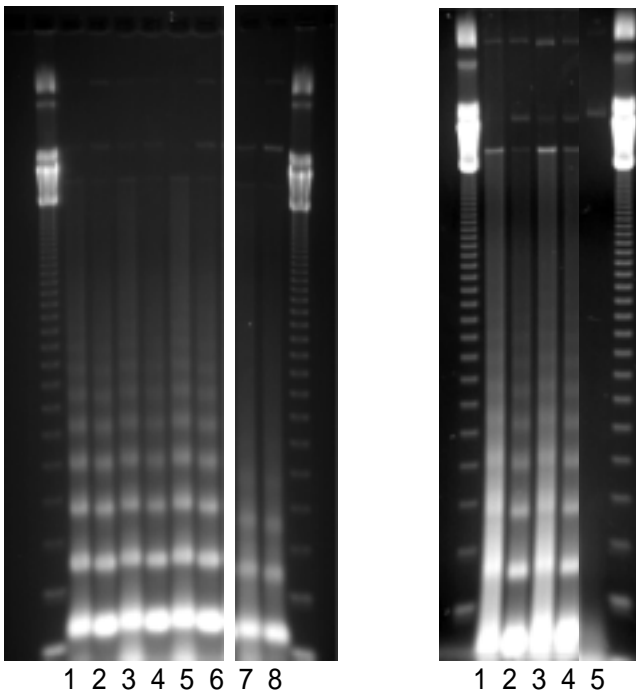
1. 5 mU/消化 (とても少量の酵素を使用した)
2. 50 mU/消化 (最良の条件)

真ん中と右のパネル :

C.A. Kit に添付されている以外の MNase でも解析した :

3. 2.5 U / 消化
4. 10 U / 消化
5. 0.5 U / 消化
6. 2.5 U / 消化
7. 10.0 U / 消化

図 2.



消化解析による C.A. titration

ヒストンコアと組み換えタンパク質の RSF/NAP-1 で形成されたコントロール DNA の Micrococcal nuclease 消化解析。

C.A. titration は 1 C.A. 反応あたり、固定された DNA 量と一連のヒストンコアの量で行われた。DNA はキアゲンのキットを用いて精製された。分子量マーカーはアガロースゲルの両側にある。

- 1 と 2 : 少量のヒストンコア
- 3 と 4 : 中間量のヒストンコア
- 5 と 6 : 多量のヒストンコア
- 7 と 8 : ネガティブコントロール : RSF と NAP-1 が添加されない。

左のパネル : 25.00 mU MNase / 消化 (1, 3, 5)
50.00 mU MNase / 消化 (2, 4, 6)

右のパネル : 10.00 mU MNase / 消化 (1, 3)
25.00 mU MNase / 消化 (2, 4)
mock C.A. (5)

ステップ 3 : 最終的な至適化された Chromatin Assembly (最良の titer を用いる)

このステップ 3 の後、得られたクロマチンはステップ 4 で C.A. 精製が行われる。

45. 最良の条件 (上記の titration により決定された) で、2 連で Chromatin Assembly 反応を行う。下の表 9 に選ばれた条件の例を示す。上記のポイント 3 から 7 を参照し、2 連でこれらのステップを繰り返す (以後 : 2 反応)。

表 9 : 最適化された chromatin assembly 反応の例

C.A. Mix コンポーネント	C.A. Mix	コメント
Buffer A	110.30 μ l	あなたの DNA に最適な量
10 \times complete ATP mix	15.00 μ l	固定量
Histones	1.80 μ l	あなたの DNA に最適な量
Blocker	3.00 μ l	固定量
RSF + NAP-1	3.50 μ l	固定量
Buffer B	6.40 μ l	固定量
あなたの DNA サンプル (2 μ g)	10.00 μ l	固定量
トータル容量	150.00 μ l	固定量

46. 30 分で一晩インキュベートする。

ステップ 4 : 形成されたクロマチンの精製

その後の in vitro 実験で、きれいな形成されたクロマチンを使用することは重要である。形成したクロマチンを用いる in vitro 解析に進む前に、フリーのタンパク質を除去し、バッファー交換する。プロトコールと結果を以下に示す。低温室で操作することを勧める。

形成されたクロマチンを精製する。

47. クロマチンは 2% または 4% のアガロースビーズのカラムで精製する (cat#: A-1040-M, ABT, Agarose Bead Technologies : <http://www.abtbeads.com/>)
❖ または、sepharose CL-4B column (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を使用する。
48. 低温室でカラムを操作する。
49. カラム (例 : 0.5 \times 20 cm のガラスエコノカラム (BioRad)) にレジン (4 ml) をつめる。
50. バッファー (10 mM Hepes pH 7.5、1 mM EDTA) で平衡化する。

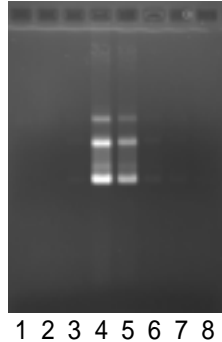
51. 8本の新しい1.5 ml チューブをラベルし (F1、F2、F3、F4、F5、F6、F7、F8)、氷上に置く。
52. C.A.2 反応分を1本のチューブに合わせる。
53. クロマチン (2 反応分: トータル容量、300 μ l) をカラムベッドにのせる。
54. バッファー (フロースルー) を1本のチューブに集める。
55. サンプルをレジンに完全にしみ込ませる。2~3 分間かかる。
56. 200 μ l のバッファーをカラムにのせる。カラムの表面を乱さないようにする。
57. 最初のチューブ (フラクション F1) に集める。
58. 500 μ l のバッファーをカラムの上のにのせる。
59. 次のチューブ (F2) にさらに 500 μ l のフラクションを集める。
60. 以下のことを6回繰り返す: 250 μ l のバッファーを連続して添加する。
61. 異なる 1.5 ml チューブ (F3 から F8) に、250 μ l ずつ6フラクションを集める。
62. 下の図6に示したように、クロマチンはたいていフラクション F4~F5 に溶出する。
63. カラム容量の3倍量のバッファー (10 mM HEPES pH 7.5、1 mM EDTA) でカラムを洗浄し、次に使うまで4 で保存する。

クロマチン溶出を解析する。

64. 新しいチューブにラベルする (F1~F8)。
65. 電気泳動解析のために、各フラクションから 20 μ l を新しいチューブに移し、2.5 μ l の 10% SDS と 5 μ l の 6 \times ローディングバッファーを添加する。
66. 65 で 10 分間インキュベートする。
67. その間に、C.A. 反応液を 4 に保存し、直接 *in vitro* 解析に使用する。サンプルは 4 で 1 週間保存できる。
68. 1%のアガロースゲル電気泳動で解析する (約 9 cm 長のゲル)。
69. 150 V で約 1 時間泳動する (私たちの条件では)。

70. エチジウムブロマイドの入ったウォーターバスで 30 分間インキュベートする。
71. アガロースゲルを水で 30 分間インキュベートする。
72. UV ランプ下で、ゲルの写真を撮る（下の図 6 参照）。

図 6.



精製されたクロマチンフラクションのアガロースゲル解析。

レーン 1 から 8 : それぞれフラクション F1 から F8

形成されたクロマチンはフラクション F4 と F5 にある。

73. 精製されたクロマチンを含む最初のフラクションを *in vitro* 解析に使用する。

5. 追加プロトコール

- In vitro **Chromatin Immunoprecipitation** (ChIP) (Pavri et al, 2006)
- In vitro transcription assays (Loyola et al, 2001)
- 電子顕微鏡検査 (E.M.) (Trojer et al, 2007)

備考：酵素による解析を行うのであれば、塩透析法を勧める（はじめに、参照）。

プロトコール

In vitro ChIP

- モノヌクレオソームを作るために、精製した C.A. サンプルを micrococcal nuclease で処理する。
- Protein G ビーズ（サケ精子 DNA でブロックされている）とインキュベートすることによりサンプルをプレクリアする。
- 興味のある抗体と 4℃ で一晩インキュベートする。
- Protein G ビーズを添加して免疫複合体を回収する。
- 1時間インキュベートする。
- ビーズを洗浄する。
- 結合した DNA を溶出する。
- DNA を精製する。
- サンプルを変性する
- ナイロンメンブレンにサンプルをドットプロットする。
- 放射性ラベルしたプローブとハイブリダイズする。
- プロットを洗浄して、現像、オートラジオグラフィーにより可視化する。

In vitro 転写

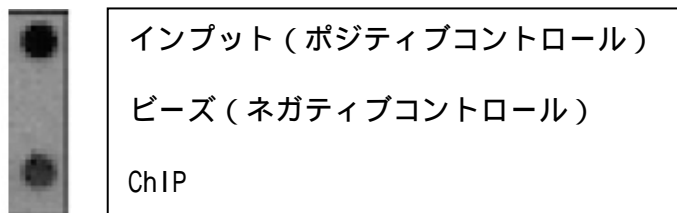
In vitro 転写は必要な調節因子と精製したクロマチンを用いて行われる。基本的な転写は組み換え TBP、TF B、TF E、TF F（大腸菌で発現させた）と高度に精製された RNA ポリメラーゼ と TF H（HeLa 細胞から精製）を用いて再構成される。得られた RNA 産物は除タンパク、エタノール沈殿して 6% 変性ポリアクリルアミドゲルで解析される。

電子顕微鏡検査 (E.M.)

- 精製したクロマチンと終濃度 2 mM のスペルミジンを含むバッファーを混合する。
- グロー放電してカーボンコートしたグリッドに吸着させる。
- 濃度勾配をもたせたエタノールで順次洗浄し、タングステンでロータリーシャドウイング法を行う。
- 透過型電子顕微鏡を用いてサンプルを検査する。

結果

In vitro ChIP



In vitro ChIP の結果。転写解析で用いた形成されたクロマチンは、続いて免疫沈降 (IP) とドットプロットに用いられた。上：インプット (ポジティブコントロール)。中：ビーズのみ。IP 実験にクロマチンを使用しない (ネガティブコントロール)。下：ChIP。

転写解析



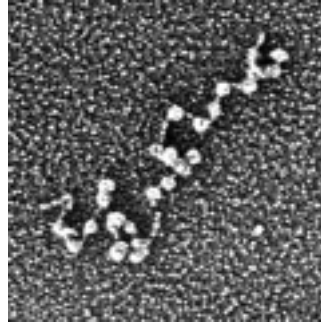
RSF で形成したクロマチン上で再構成した転写の結果を上を示す。転写は FACT (facilitates chromatin transcription) の存在下 (レーン 2) または非存在下 (レーン 1) で、再構成システムを用いて行われた。転写反応産物は変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動して分離した。FACT 存在下で全長の転写産物がはっきりと見えている (レーン 2)。

電子顕微鏡検査

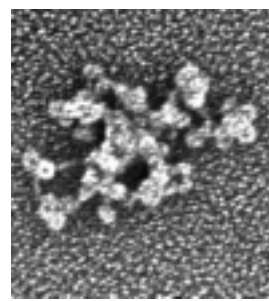
環状 5 kb DNA



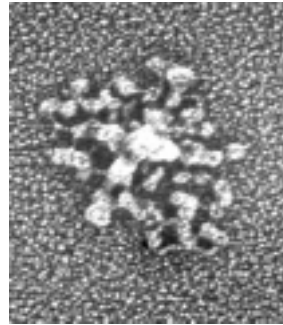
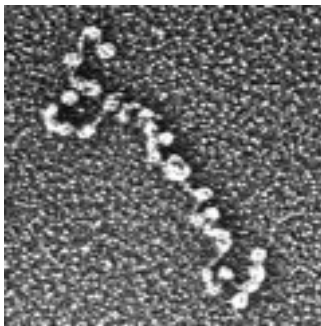
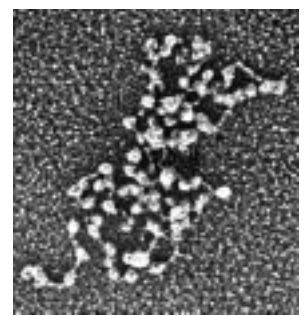
直鎖状 5 kb DNA



環状 20 kb DNA



直鎖状 20 kb DNA



In vitro C.A. Kit を用いて形成されたクロマチンの電子顕微鏡画像。上の写真に示したように、小さな DNA と大きな DNA、環状と直鎖状の DNA が使用された。電子顕微鏡実験は、Diagenode 社の C.A. Kit プロトコールを用いて形成されたクロマチンで行われた。電子顕微鏡検査のプロトコールは、先のセクションで紹介されている。生理的な状態で形成されたクロマチンの電子顕微鏡検査を行うことは、あなたの興味のあるサンプルの機能や構造を解析するのに重要である。

5 kb の DNA で約 25 個のヌクレオソームを見ることができ（左側）。より大きな DNA を用いると、ヌクレオソームはよりはっきり見えるが、形成されたクロマチンは塊を作り、環状 DNA ではとても密集した構造になる（右側）。

6. トラブルシューティングガイド

ステップ	トラブル	解決法
DNA の調製	質が良くない。 MNase 消化を行ったときに、スメアになったり、6 個未満のバンドになったりする。	DNA の塩化セシウム精製が最適である。 マニュアルのプロトコール参照。
C.A. titration	もし、行わないならば、C.A. 反応は失敗するかもしれない。	ヒストンと DNA の比はとても重要である。
	ヒストンが少なすぎる。 バンドがモノヌクレオソームよりも低い。	ヒストン/DNA の比はとても重要なので、Titration は欠かせない。 (プロトコール参照)
	ヒストンが多すぎる。 DNA が多くて切れない、またはスメアになる。	ヒストン/DNA の比はとても重要なので、Titration は欠かせない。 (プロトコール参照)
MNase 消化	6 個未満のクリアなバンドが見られるなら：サンプルは消化されすぎている。	より少ない酵素で消化する。
	スメアになっているが、いくつかのバンドが見えるなら（ぼんやりと）：サンプルは消化されていない。	より多い酵素で消化する。
10x ATP Mix	作用していない。	毎回新しく調製する。
タンパク質は分注して -80 に保存する。	作用していない。	2~3 回以上凍結融解しない。
DNA サンプル	少なすぎる DNA や多すぎる DNA を使用すると、悪い C.A. の結果になる。	DNA サンプルは正しい濃度で使用する：C.A. 1 反応あたり 2 µg 使用する。 あなたの DNA サンプルの濃度を測定するときに、参考として私たちの DNA コントロールを使用する。
Buffer C	MNase 停止バッファーに沈殿が見える。	使用前に温める。
チューブ	主に 1.5 ml チューブ、シリコナイズしたチューブの必要はない。	我々の結果：シリコナイズしていないチューブを使用している。
MNase 消化解析	悪い画像	アガロースゲルの泳動。 ゲルの中にエチジウムブロマイドを入れない。泳動後にゲルを染色する。

C.A. 精製	クロマチンの分解	4 に保つ。
	精製が完全でなかったら、in vitro の解析で悪い結果が得られるかもしれない。	精製は重要である。精製したクロマチンは良い結果をもたらすだろう。
C.A. 保存	C.A. 反応の後、すぐに精製が実行されなかったら、in vitro の解析で悪い結果が得られるかもしれない。	1 日以上、精製していない C.A. を保存しない。
	精製後すぐに、精製したクロマチンを使用し、正しい温度で保存する。	4 で一週間以上置かない。 凍結厳禁。
精製していない C.A. で操作する。	in vitro のテストで、精製していないクロマチンを処理したら、結果に説得力がない。	精製によってタンパク質を取り除く。精製ステップは重要である。
1 回の精製のために C.A. 反応を合わせる。	精製の後、より多くの材料を得るために、2 回分の C.A. を合わせる。	1 反応ではカラムに通すには少し薄いので、2 反応分の C.A. を合わせることを勧める。それゆえ、2 C.A. 反応を合わせてカラムに流すのはより良いことである。
他のヒストン	キット添付ではないヒストンを使用する。 組み換えヒストンを使用する（ネイティブが提供されている）。	可能だが、titration は重要である。 組み換えヒストンを使用すると、C.A. の効率が少し低下する。 アセチル化した組み換えヒストンを勧める（Loyola, 2001）。 キット添付のヒストンは濃度が 0.9 μg/μl であることに注意する。
遠心	$\times g$ と回転数	$g = 11.18 \times r \times (\text{rpm}/1000)^2$; r は回転半径 (mm) http://www.msu.edu/~venkata1/gforce.htm

7. 参考資料

- ❖ LeRoy G., Orphanides G., Lane W.S. and Reinberg D. (1998) *Science* 282:1900-4.
- ❖ Lusser A and Kadonaga J.T. (2004) *Nat Methods* 1(1):19-26.
- ❖ Loyola A., Huang J.-Y., LeRoy G. et al. (2003a) *Molecular and Cellular Biology* 23:6759-68.
- ❖ Loyola A. and Reinberg D. (2003b) *Methods* 31:96-103.
- ❖ Loyola A., LeRoy G., Wang Y.-H. and Reinberg D. (2001) *Genes and Development* 15:2837-51.
- ❖ Pavri R., Zhun B., Li G. et al. (2006) *Cell* 125:703-17.
- ❖ Pazin M.J., Kamakaka R.T. and Kadonaga J.T. (1994) *Science* 266:2007-11.
- ❖ Trojer P., Li G., Sims R.J. et al. (2007) *Cell* 129:915-28.
- ❖ Wolffe, A. (1998) *Chromatin: structure and function*. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.

8. お問い合わせ

Diagenode社製品については、株式会社ニッポンジーン 研究試薬部までお問い合わせください。

株式会社ニッポンジーン 研究試薬部

930-0834 富山県富山市問屋町1-8-7

TEL : 076-451-6548

FAX : 076-451-6547

E-mail : info@nippongene.com

HP : <http://www.nippongene.com>

Diagenode s.a. Europe, Asia & Australia

CHU, Tour GIGA B34, 3eme etage

Avenue de l'Hopital, n° 1

4000 Sart-Tilman Liege BELGIUM

Phone : +32 (0) 4 364 20 50

Fax : +32 (0) 4 364 20 51

Email : info@diagenode.com

Diagenode Inc. USA

376 Lafayette Road, Suite 202

Sparta, NJ 07871

Phone : +1 973 300 0976

Fax : +1 973 300 1862

Email : infousa@diagenode.com

Diagenode website : [Hhttp://www.diagenode.com/](http://www.diagenode.com/)