

キット内容 16回分

内容	容量	保存温度
Buffer A	25ml	4℃
Buffer B	3ml	4℃/室温
Buffer C	4ml	4℃
1.25M Glycine	2ml	4℃
Protease Inhibitor mix (P.I. 200×)	100 μl	-20℃
Protein A-coated paramagnetic beads	220 μl	4℃(凍結厳禁)
Negative Ctrl IgG from rabbit	15 μl	4℃
DNA purifying slurry	3ml	4℃
Proteinase K	30 μl	-20℃
PCR-grade H ₂ O	4ml	4℃
PCR tube strips	4	室温
PCR strip caps	4	室温
Human SAT 2 primer pair	50 μl	-20℃
Human c-fos promotior primer pair	50 μl	-20℃
Human myoglobin exon 2 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

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)
・ RNase/DNase freeの1.5 mlチューブ及び0.5mlチューブ
・ RNase/DNase freeの0.2mlチューブ(オプション)
・ 15ml及び50ml コニカルチューブ
・ オートクレーブ滅菌済みのピペットチップ
・ フィルターチップ
・ チューブクラップ
・ PBS
・ 1M Sodium butyrate (NaBu)
・ トリプシン-EDTA
・ ホルムアルデヒド
・ 抗体
・ 100%エタノール
・ 70%エタノール
・ 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)
・ 電気泳動用試薬
・ リアルタイムPCR用試薬

装置
・ Magnetic Rack
・ 卓上小型遠心機(8連チューブ、0.5mlチューブ)
・ 冷却遠心機(1.5ml)
・ 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
・ フロート(1.5ml)
・ 沸騰浴
・ サーマミキサー又は振とうヒートブロック(55℃)
・ 定量PCR装置
・ アガロースゲル電気泳動装置

Magnetic Rack(別売)

(Code No.314-80751)

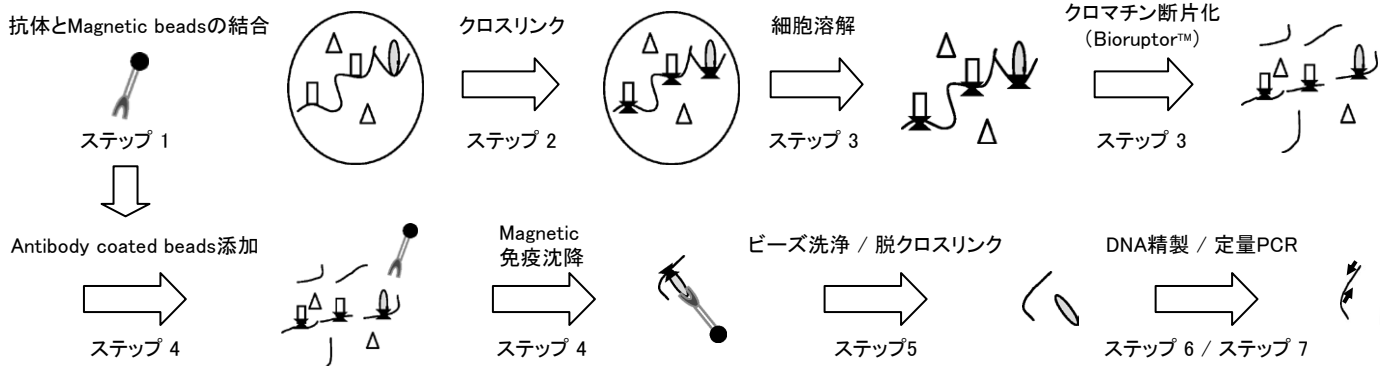
スターティングマテリアル

必要な細胞数 1,000~100,000細胞/ChIP

LowCell# 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(抗体とMagnetic beadsの結合)	1日目	30分間+インキュベーション
ステップ 2(細胞の回収とクロスリンク)	1日目	1時間
ステップ 3(細胞の溶解とクロマチン断片化)	1日目	1時間
ステップ 4(Magnetic免疫沈降)	1日目	30分間+2時間から一晩インキュベーション
ステップ 5(ビーズ洗浄)	1日目または2日目	1時間
ステップ 6(DNA精製)	1日目または2日目	2時間
ステップ 7(定量PCR)	1日目または2日目	3時間

キットの概要



ステップ 1 – 抗体とMagnetic beadsの結合

Protein A-coated paramagnetic beads を均一にサスペンドする。

ビーズの凍結厳禁
ビーズをピペットでとるときは、必ず懸濁してとること。

必要量のProtein A-coated paramagnetic beads を1.5mlチューブに移す(1 IPあたり、11 μ lのビーズ を洗浄する)。

←ビーズ 容量の2.5倍量のBuffer Aを添加し、ビーズを懸濁する。
(例: 8 IPの場合、88 μ lのビーズに220 μ lのBuffer Aを添加する。)

遠心(5分間、1,300rpm、4°C)
ビーズの沈殿を乱さないように、上清を除く。

もう一度繰り返す。
(ビーズの洗浄)

沈殿(ビーズ)

ストックと同じ濃度になるように、ビーズをBuffer Aで懸濁する。

PCRチューブ(0.2ml)に、90 μ lのBuffer Aを分注し、洗浄したビーズを10 μ l添加する。

抗体(目的の抗体、ポジティブ、ネガティブ)を添加する。

少なくとも2時間インキュベートする(4°C、ローター、40rpm)。

Antibody coated beads(ステップ 4へ)

ステップ 2 – 細胞の回収とクロスリンク

PBS、培地、トリプシンにSodium butyrate (NaBu) または他の阻害剤を添加する。
NaBuはヒストンChIP用である。

培養細胞 *

培地を除く

← NaBu-PBSを添加

← トリプシン処理

← 培地添加(トリプシン不活性化)

遠心(5分間、1,300 rpm、室温)し、上清を除く。

沈殿(細胞)

← NaBu-PBSを添加

遠心(5分間、1,300 rpm、室温)し、上清を除く。

沈殿(細胞)

← NaBu-PBSを添加。

細胞をカウントする。

①1,000,000細胞/500 μ l または

②100,000細胞/500 μ l または

③10,000細胞/500 μ l になるようにNaBu-PBSを添加。

← 500 μ lあたり13.5 μ lの36.6%ホルムアルデヒド添加。

穏やかにボルテックス

室温、8分間インキュベート (クロスリンクステップ **)

← 500 μ lあたり57 μ lの1.25M Glycine添加。

穏やかにボルテックス

室温、5分間インキュベート (クロスリンク反応停止)

遠心(10分間、470 \times g、4°C)し、上清を除く。

沈殿(クロスリンクした細胞)

ステップ 3へ

* : 上記プロトコルは接着細胞の場合。浮遊細胞を使用する場合は、Instruction Manual 参照。

** : クロスリンクの条件は、細胞の種類や、ターゲットとするタンパク質によって異なるので、条件を至適化することが望ましい。
詳細についてはInstruction Manual参照。

ステップ 3 – 細胞の溶解とクロマチン断片化

Buffer Bを室温に置いておく。
氷上で操作する。

クロスリンクした細胞(ステップ 2より)

← 氷冷したNaBu-PBS 0.5mlを添加し、沈殿を懸濁する。

遠心(10分間、470 \times g、4°C)し、上清を除く。

沈殿(細胞)

もう一度繰り返す。

Buffer B(室温)にProtease Inhibitor mix (P.I. 200 \times)
と終濃度20mMのNaBuを添加する。(完全なBuffer B)

← 130 μ lの完全なBuffer B(室温) 添加。

懸濁するまでボルテックス

氷上、5分間インキュベート (細胞の溶解ステップ)

クロマチン断片化用サンプル

クロマチン断片化(Bioruptor™ を使用) *

[30秒間 ON / 30秒間 OFF] \times 12サイクル (0°C)

Buffer A にProtease Inhibitor mix (P.I. 200 \times)と終濃度20mMのNaBuを添加する。(完全なBuffer A)

断片化クロマチン

液体窒素で瞬間凍結し、-80°Cで保存する。
すぐに使用する場合は、そのまま使用する。

← 870 μ lの完全なBuffer Aを添加(トータル 1ml)。

希釈した断片化クロマチン

ステップ 4へ(1 IPあたり100 μ lの断片化クロマチンを使用する。)

①1,000,000細胞/ml (1 IPあたり、100,000細胞)

②100,000細胞/ml (1 IPあたり、10,000細胞)

③10,000細胞/ml (1 IPあたり、1,000細胞)

* : Bioruptor™ を使用しない場合は、Instruction Manual 参照。

ステップ 4 及び 5- Magnetic免疫沈降と洗浄

Antibody coated beads(ステップ1より)

軽くスピンドウン
Magnetic Rackに置く(氷上、1分間)
上清を除去。

Antibody coated beads(沈殿)

←断片化クロマチン(ステップ3より) 100 μ l 添加。
2時間から一晩インキュベート(ローテーター、40rpm、4°C)
(免疫セレクション)*
Magnetic Rackに置く(1分間)。
上清を除去。

一部(100 μ l)をインプットサンプルとして4°Cで保存する。

抗体-クロマチン-ビーズ(沈殿)

←氷冷したBuffer Aを100 μ l 添加し、転倒混和。
ローテーター(40rpm)で4分間インキュベート(4°C)
Magnetic Rackに置く(1分間)。
上清を除去。

さらに2回繰り返す。
(洗浄操作)

抗体-クロマチン-ビーズ(沈殿)

←Buffer Cを100 μ l 添加し、転倒混和。
ローテーター(40rpm)で4分間インキュベート(4°C)
Magnetic Rackに置く(1分間)。
上清を除去。

抗体-クロマチン-ビーズ(沈殿) ステップ 6へ

*:使用する抗体により、免疫セレクションのインキュベーション時間を最適化する。
*:免疫セレクションに超音波ウォーターバスを利用する場合は、Instruction Manualの追加プロトコール参照。

ステップ 6- DNA精製

沸騰浴を準備する。

抗体-クロマチン-ビーズ(沈殿、0.2mlチューブ)ステップ 5より

←DNA purifying slurry 100 μ l 添加。
ピペッティング
新しい1.5mlチューブに移す。

希釈した断片化クロマチン(ステップ 3より) 100 μ l(1.5mlチューブ)に、
DNA purifying slurry 100 μ l を添加(インプットサンプル)。
これ以降の操作は、インプットサンプルもあわせて一緒に行う。

抗体-クロマチン-ビーズ(沈殿)(1.5mlチューブ)

チューブクラブでチューブをロックする。
ボイル(10分間、沸騰浴)
チューブクラブをはずし、サンプルが冷めるまで待つ。
← Proteinase K 添加(IPサンプルには1 μ l、インプットサンプルには2 μ l)、ボルテックス(ミディアムパワー、2秒間)
サーモミキサーでインキュベート(1,000 rpm、30分間、55°C)
チューブクラブでチューブをロックする。
ボイル(10分間、沸騰浴)
遠心(1分間、14,000 \times g、4°C)

上清をそれぞれ新しいチューブに移す。

IPサンプル上清(50 μ l)
インプットサンプル上清(150 μ l)

沈殿(IPサンプルのみ、インプットサンプルの沈殿は捨てる)

← PCR-grade H₂O 100 μ l 添加、ボルテックス(ミディアムパワー、10秒間)
遠心(1分間、14,000 \times g、4°C)

上清(100 μ l)

精製DNA (150 μ l)

ステップ 7へ(すぐに使用しない場合は-20°Cで保存する。)

ステップ 7- 定量PCR

定量PCRの詳細はInstruction Manual参照

反応液 (1反応)

マスターミックス	12.5 μ l
Primer pair	1 μ l
Water	6.5 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°C	3分間
95°C	30秒間
60°C	30秒間
72°C	30秒間

×40サイクル

検出

SYBR Green



データ解析へ

お問い合わせ :

株式会社ニッポンジーン 研究試薬部 930-0834 富山県富山市問屋町1-8-7 TEL: 076-451-6548 FAX: 076-451-6547 E-mail: info@nippongene.com