



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

<http://www.diagenode.com/>

LowCell# ChIP Kit™

The Low Cell Number Magnetic Chromatin Immunoprecipitation Kit

NIPPON GENE Code No.311-80761
(Diagenode Catalog #: kch-maglow-016)

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

このマニュアルは、Diagenode 社の LowCell# ChIP 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.	キットの概要とタイムテーブル	5
3.	キットの構成	6
	キット内容	6
	本品以外に必要な試薬・消耗品・装置	6
	キットのアッセイショートプロトコール	8
4.	キットのアッセイプロトコール	11
	注意事項	11
	LowCell# ChIP:ステップ 1 (抗体とビーズの結合)	12
	LowCell# ChIP:ステップ 2 (細胞のクロスリンク)	13
	LowCell# ChIP:ステップ 3 (細胞の溶解、クロマチン断片化)	15
	LowCell# ChIP:ステップ 4 及び 5 (免疫沈降と洗浄)	17
	LowCell# ChIP:ステップ 6 (DNA 精製)	19
	LowCell# ChIP:ステップ 7 (定量 PCR)	21
	補注	23
	LowCell# ChIP の結果	25
5.	トラブルシューティングガイドと注意事項	32
6.	追加プロトコール	36
7.	参考資料	39
8.	お問い合わせ	39
9.	従来の ChIP と LowCell# Magnetic ChIP の比較	40
10.	クイックチャート	41

1. はじめに

タンパク質と DNA の結合は、遺伝子の転写やエピジェネティックなサイレンシングのように、多くの生きた細胞の機能に重要です。DNA 結合タンパク質のゲノム上のターゲットと遺伝子調節経路や細胞の増殖をコントロールしているそれらのメカニズムを知ることは重要です。

クロマチン免疫沈降 (ChIP) はインタクトな細胞における、タンパク質と特定ゲノム領域との結合を解析する技術で、エピジェネティックな修飾の変化や、クロマチンリモデリング、転写調節因子の特定のゲノム位置へのリクルートを決定するために使われています (1)。ChIP 解析の主なステップは、細胞の固定 (クロスリンク)、クロマチンの断片化、免疫セレクション、免疫沈降、そして免疫沈降された DNA の解析です。

はじめに、細胞はクロスリンク試薬により短時間で可逆的に固定されます。次に、クロスリンクされたクロマチン (DNA とタンパク質) は断片化され、興味のあるタンパク質と結合した DNA 断片が、特異的な抗体により免疫沈降 (IP) されます。最後に、免疫沈降された DNA は定量ポリメラーゼ連鎖反応 (定量 PCR)、ChIP-chip やシーケンシングにより、特定の配列の存在が調べられます。その沈殿の中に特定の配列がたくさんあるということは、興味のあるタンパク質がその配列と *in vivo* で結合していることを示しています。

生きている細胞において、DNA-タンパク質の相互作用を固定する手法として、最も広く使われているのは、アミノ基またはイミノ基と核酸との間に共有結合をつくるホルムアルデヒド固定 (クロスリンク) です (2)。ホルムアルデヒドは、タンパク質-タンパク質の複合体同様、DNA-タンパク質の複合体を *in situ* でクロスリンクします。クロスリンクの後、クロマチンは免疫沈降 (IP) 用に、極めて効率的に均一な小断片に切断される必要があります。Diagenode 社の **Bioruptor™** は、ChIP 用の高品質なクロマチン断片を調整することができます。さらに、**断片化モジュール**は、簡単で高い再現性をもつ断片化の方法として、Diagenode 社から入手できます。そして、抗体結合ビーズと特異的な ChIP グレード抗体は、ゲノム DNA 断片とクロスリンクしたタンパク質を沈殿させるために必要です。最後に、特異的に免疫沈降された特定の DNA 断片の相対的な量は、ゲノム上の特定部位に局在するタンパク質の量として、定量 PCR によって決定されます。**ChIP グレードビーズ、抗体、定量 PCR 用プライマーペア**は Diagenode 社から入手できます。

ChIP はとても用途の多いツールですが、操作にはいくつかの反応条件の面倒な最適化が必要です。Diagenode 社は、ChIP 解析のために最適化された試薬と簡便なプロトコールからなるキットを提供しています。従来の ChIP 解析のもう一つの主な欠点は、時間がかかるということです。2 回のオーバーナイトのインキュベーションが含まれます (抗体とターゲットの結合、免疫沈降した DNA の精製)。それゆえ、Diagenode 社では従来の ChIP 解析法 (転写因子用にデザインされた Red ChIP Kit とヒストン用にデザインされた Orange ChIP Kit) だけでなく、**迅速 ChIP 法 (OneDay ChIP Kit)** のキットも提供しています。**LowCell# ChIP Kit** は、OneDay ChIP Kit と同じ利点をいくつか利用しているので、一日で行うこともできます。

OneDay ChIP の方法において、プロトコールは一日または一週間あたり、よりたくさんの ChIP を行えるように、ChIP 手順の有用性を高めようと改良されてきました。全体の手順は 2 回のオーバーナイトインキュベーションをなくしたので、一日で行うことができます。二つの主要なステップが大いに短縮されています: 1) 抗体の結合は、超音波ウォーターバス中でクロマチンと抗体をインキュベーションすることで、促進されます (3)。2) DNA 精製は DNA purifying slurry の使用で簡単になり、多数のステップが省略され、速くなります (キットの概要参照)。また、超音波ウォーターバスがない場合には、従来通りのオーバーナイトでの抗体とクロマチンのインキュベーションを含め、2 日間で操作を行うこともできます。OneDay ChIP Kit は 2 種類のキット構成が入手できます: 一つは 60 回用でもう一つは 180 回用です。

LowCell# ChIP Kit のプロトコールは、研究者が従来用いてきたよりもより少量の細胞で操作できるように改良されています。例えば、8,000 細胞のように少ない細胞からのクロマチンサンプルで、6 種類の抗体と 2 種類のコントロール（ネガティブとポジティブ）のヒストン ChIP に用いることができます。

LowCell# ChIP Kit は、一反応あたり少量の試薬（細胞だけでなく、抗体、阻害剤、バッファー）で行えます。本キットは他のキットに比べてバッファーの種類が少ないため、安価で、操作が簡単です。Diagenode 社の LowCell# Magnetic の手順はステップの数が少なく、ハンドリングが容易です。

そのうえ、この新しい LowCell# Magnetic ChIP プロトコールと共に Diagenode 社の Magnetic Rack を使用すると、常に低温で操作することが可能になり、最も良い IP 状態を確実にします。Magnetic Rack はサンプルをより長く低温に保ち、反応容量と試薬の無駄を減らすために小さなチューブを使用するような IP 実験用にデザインされています。

本キットのクロマチン断片化プロトコールは、従来品の Shearing Kit と Bioruptor で確認されています。しかしながら、使用する前に効率をチェックするのであれば、各自のプロトコールと超音波処理装置でクロマチンを断片化することができます（＜重要事項＞セクション参照：プロトコールとキットの互換性）。

Diagenode 社の LowCell# ChIP Kit は、ウサギのポリクローナル抗体で 사용할 ことができる protein A-coated paramagnetic beads（そして negative IgG from rabbit）が含まれます。ポジティブコントロールやターゲットの抗体として、主なヒストン修飾やあなたの興味のあるタンパク質に対する Diagenode 社の ChIP グレードのウサギポリクローナル抗体の一つを選んでください。

もし、モノクローナル抗体で ChIP 実験を行うのであれば、Diagenode 社は negative IgG from mouse と protein G-coated paramagnetic beads も提供しています。ポジティブ ChIP コントロールについては、ChIP グレードモノクローナル抗体のリストをご覧ください。

さらに、Diagenode 社では阻害剤（ChIP グレードの Sodium butyrate）や PBS のような、一般的に用いる個々の試薬も用意しており、免疫沈降した物質の解析のための定量 PCR で確認されたいくつかの primer pairs も提供しています。また、ブロッキング実験（ネガティブ ChIP コントロール）用のペプチドも購入できます。

上記で紹介されている Diagenode 社の試薬のご購入については、ニッポンジーンまでお問い合わせください。

2. LowCell# ChIP Kit 概要とタイムテーブル

表 1: Low Cell Number Magnetic ChIP プロトコール概要

ステップ	工程	日程	所要時間
ステップ 1	抗体と <i>magnetic beads</i> 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 DNA-タンパク質のクロスリンク	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 130 μ l の Buffer B に 1,000,000 細胞 または 130 μ l の Buffer B に 100,000 細胞 (より少量の細胞の場合は、一度、断片化の効率を検討する。)	1 日目	1 時間
ステップ 4	<i>Magnetic</i> 免疫沈降 1 IP あたり 10,000 細胞または 1 IP あたり 1,000 細胞を使用。 Buffer A を 870 μ l 添加。 antibody-coated beads を添加。 	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	免疫複合体の洗浄	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 とデータ解析	1 日目 または 2 日目	3 時間

Diagenode 社の LowCell# ChIP Kit と Magnetic Rack

LowCell# ChIP Kit はユーザーフレンドリーなプロトコールはもちろん、全ての必要な至適化された試薬とバッファーを提供します。1 種類のキット形態を用意しています：キットの内容は 16 回（各 8 IP が 2 列）の ChIP 解析を行うのに十分です。
(Magnetic Rack はキットに含まれておりません。)

手順：ステップ 1 で抗体を *magnetic beads* に結合させる。1 列を使用する場合：6 種類のターゲット ChIP とコントロール抗体（ポジティブとネガティブ）を行える。2 列を使用する場合：14 ChIP までと 2 つのコントロールを行える（ステップ 1）。タンパク質と DNA のクロスリンク（ステップ 2）。クロマチン断片を作るための断片化（ステップ 3）。断片化クロマチンと antibody-coated beads をインキュベートし、免疫沈降を行う（ステップ 4）。ビーズを洗浄し、免疫沈降した DNA 断片を精製し、定量 PCR で増幅する（ステップ 5、6、7）。

**：代案：使用する抗体にもよるが、ステップ 4 の免疫セクションは、2 時間のインキュベーションで、オーバーナイトのインキュベーションの時と同じ免疫セクションの結果になる場合がある。その場合、一日で Magnetic ChIP を行うことを可能になり、一日の最後に PCR をセットして、翌日の朝、結果を見ることができる。超音波ウォーターバスを利用すると、さらに時間を短縮できる。“追加プロトコール”セクション参照。

3. キットの構成

キット内容

本品には、細胞の回収から、免疫セレクション、PCR用のDNA精製まで、ChIP解析16回分（各8IPを2列）の試薬が入っています。キット内容の詳細については表2を参照してください。
製品到着後、試薬はそれぞれ表2に示した温度で保存してください。

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）
- ・PBSバッファー
- ・1 M 酪酸ナトリウム（Sodium butyrate、NaBu）
- ・トリプシン-EDTA
- ・ホルムアルデヒド
- ・抗体
- ・RNase/DNase-freeの1.5mlチューブ及び0.5mlチューブ
- ・RNase/DNase-free 0.2mlチューブ（オプション、8連チューブを使用しない場合）
- ・15ml及び50ml コニカルチューブ
- ・エタノール 100%
- ・エタノール 70%
- ・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）
- ・アガロース
- ・TAE バッファー
- ・DNA分子量マーカー
- ・電気泳動用試薬
- ・リアルタイムPCR用試薬

装置

- ・Magnetic Rack（NIPPON GENE Code No.314-80751）
- ・卓上小型遠心機（8連チューブ、0.5mlチューブ用）
- ・冷却遠心機（1.5mlチューブ用）
- ・セルカウンター
- ・密閉式超音波細胞破碎装置 Bioruptor™（Diagenode cat #：UCD-200）*
- ・ローテーター（4 ）
- ・ボルテックス
- ・フロート（1.5mlチューブ用）
- ・チューブクラップ
- ・沸騰浴
- ・サーモシェーカー（55 ）
- ・リアルタイムPCR装置
- ・アガロースゲル電気泳動装置

*：日本国内において、密閉式超音波細胞破碎装置 Bioruptor™は、コスモ・バイオ株式会社の取り扱い製品です。Diagenode社のBioruptor™（Diagenode cat #：UCD-200）は日本では販売していません。

表 2 : LowCell# ChIP Kit内容

(**注意** : 製品到着後、各試薬は下記に示す正しい保存温度で保存して下さい。)

LowCell# ChIP Kit : The Low Cell Number Magnetic ChIP			
内容	コメント	容量	保存
Buffer A	界面活性剤、塩、イオンキレート剤ミックスが含まれます。	25ml	4
Protein A-coated paramagnetic beads	16 IP 分です。界面活性剤と 0.02% のアジ化ナトリウムが含まれます。	220 μ l	4 凍結厳禁
Negative Ctrl IgG from rabbit	1 μ g / μ l	15 μ l	4
1.25 M Glycine	-	2ml	4
Buffer B	界面活性剤とイオンキレート剤ミックスが含まれます。	3ml	4 / 室温 使用前に室温でインキュベートする
Protease Inhibitor mix (P.I. 200 \times)	200 \times のストック溶液です。	100 μ l	-20
Buffer C	イオンキレート剤ミックスが含まれます。	4ml	4
DNA purifying slurry	-	3ml	4
Proteinase K	100 \times のストック溶液です。	30 μ l	-20
PCR-grade H ₂ O	-	4ml	4
PCR tube strips	8 サンプルごとに 1 列	4	室温
PCR strip caps	8 サンプルごとに 1 列	4	室温
Human SAT 2 primer pair	5 μ M each (リバースプライマー & フォワードプライマー)	50 μ l	-20
Human c-fos promoter primer pair	5 μ M each (リバースプライマー & フォワードプライマー)	50 μ l	-20
Human myoglobin exon 2 primer pair	5 μ M each (リバースプライマー & フォワードプライマー)	50 μ l	-20
Magnetic ChIP 関連製品			
内容	コメント	容量	保存
Magnetic Rack	16 反应用	1	室温
1 M Sodium butyrate	50 \times のストック溶液です。	1ml	-20
Protein G-coated paramagnetic beads	-	220 μ l	4
Negative Ctrl IgG from mouse	1 μ g / μ l	15 μ l	4
PBS	-	50 ml	-20
Antibodies	-	<i>Diagenode 社のウェブサイト参照</i>	
Peptides	-	<i>Diagenode 社のウェブサイト参照</i>	
Primer pairs	5 μ M each (リバースプライマー & フォワードプライマー)	<i>Diagenode 社のウェブサイト参照</i>	

キットのアッセイショートプロトコール (7ステップ)

LowCell# Chromatin IP : *Magnetic ChIP*

ステップ 1.抗体とmagnetic beadsの結合

1. *Protein A-coated paramagnetic beads* を、氷冷した *Buffer A* で次のように 2 回洗浄する :
Buffer A を添加し、*Buffer A* でビーズを懸濁する。次に、1,300rpm で 5 分間遠心し、上清を捨てビーズの沈殿を残す。1 IPあたり 10 μ l のビーズが必要である。スケールは調整する。
2. 洗浄の後、ストックと同じビーズ濃度になるように *Buffer A* を添加し懸濁する。
3. 各 *Magnetic ChIP* 反応のために、0.2ml の PCR チューブに 90 μ l の *Buffer A* を分注する。
4. IP チューブに、洗浄した *Protein A-beads* を 10 μ l 添加する。
5. 特異的な抗体及びコントロールの抗体 (ポジティブとネガティブ) を添加する。
6. 40rpm のローターで、IP チューブを 4 で少なくとも 2 時間インキュベートする。

ステップ 2.細胞の回収とDNA-タンパク質のクロスリンク

7. 細胞を回収する前に、必要であれば阻害剤を培地に加え、穏やかに混合する。
8. セクション "4.キットのアッセイプロトコール" に書かれているように細胞を調整する。
9. 細胞をカウントする。
10. 新しい 1.5ml チューブにラベルして、細胞を加えた後最終的に 500 μ l になるように、PBS (阻害剤を含む) を添加する。細胞を移して入念にピペットチップを洗浄する。
11. サンプル 500 μ l あたり、36.6%ホルムアルデヒドを 13.5 μ l 添加する。
12. 穏やかにボルテックスして混合する。固定するために、室温で 8 分間インキュベートする。
13. サンプルに 1.25M *Glycine* を 57 μ l 添加する。
14. 穏やかにボルテックスして混合する。室温で 5 分間インキュベートする。これで固定を停止させる。
----- これ以降は氷上で操作する。 -----
15. 4 で 470 x g、10 分間、遠心する。
16. 上清をアスピレートする。細胞を除かないように注意する。ゆっくりとアスピレートし、溶液を約 30 μ l 残す。

ステップ 3.細胞の溶解とBioruptorによるクロマチンの断片化

17. クロスリンクした細胞を、0.5ml の氷冷した PBS (*NaBu* 及び/または、選んだ他の阻害剤を添加する) で 2 回洗浄する。溶液を添加して、穏やかにボルテックスし、4 で 470 x g (減速の設定をソフトにして、スイングアウトのローターを使用する)、10 分間、遠心する。
18. 最後の洗浄の後、上清をアスピレートする。溶液を 10~20 μ l 残す。
19. *Buffer B* (室温) に *Protease inhibitor* と *NaBu* を添加する。これが完全な *Buffer B* である。バッファーは使用するまで室温に置いておき、その日に使わなかった分は捨てる。
20. 細胞に 130 μ l の完全な *Buffer B* (室温) を添加する。懸濁するまでボルテックスする。氷上で 5 分間インキュベートする。

21. サンプルは、Bioruptor™ を使って各[30 秒間 “ON”、30 秒間 “OFF”]を 12 サイクルで超音波破碎して、クロマチンを断片化する。
22. 断片化クロマチンはそのまま ChIP に使用する。
23. **Buffer A** 1ml あたり 5µl の **Protease Inhibitor mix** を添加する。Buffer A に NaBu (終濃度 20mM) または他の阻害剤を添加する。
24. 130µl の断片化クロマチンに、870µl の完全な **Buffer A** を添加する。
25. 解析ステップ。“追加プロトコール” セクション参照。断片化の効率を評価して、次のステップに進む。

ステップ 4 及び 5. Magnetic 免疫沈降と洗浄

26. 蓋についた溶液を落とすために、antibody-coated beads (ステップ 1、ポイント 6) の入った 0.2ml チューブを軽くスピンする。
27. チューブを、氷冷した **Magnetic Rack** (予め氷上に置いて冷やしておく) に置き、1 分間待つ。
28. 上清を捨てる。antibody-coated beads の沈殿を残す。
29. 1 IP あたり 100µl の希釈した断片化クロマチンを使用する (ステップ 3、ポイント 24)。各 IP チューブ (0.2ml) に 100µl 移す。100µl をインプットサンプルとして 4 に保存する。
30. チューブの蓋を閉め、磁場からチューブを取り出す。
31. 40rpm のローテーターで 2 時間から一晩、4 でインキュベートする。インキュベーション時間を短縮するために超音波ウォーターバスを使用する場合は、“追加プロトコール” セクション参照。

----- 1 日目または 2 日目 -----

32. チューブを **Magnetic Rack** に置いて 1 分間待ち、バッファーを捨てる。100µl の氷冷した **Buffer A** で 3 回洗浄する。各洗浄は次のように行う：バッファーを添加、転倒混和し、ローテーター (40rpm) で 4、4 分間インキュベート、スピンして、**Magnetic Rack** に置いて 1 分間待ち、バッファーを捨てる。捕捉したビーズをキープする。
33. **Buffer C** で 1 回洗浄する：ビーズに 100µl の **Buffer C** を添加し転倒混和する。ローテーター (40rpm) で 4、4 分間インキュベートする。スピンして、洗浄後に **Magnetic Rack** にビーズの入ったチューブを置き、ビーズを捕捉して **Buffer C** を除く。

ステップ 6. DNA 精製

34. 沸騰浴を準備する。
35. 新しい 1.5ml チューブにラベルする。IP 番号 1~8 (1 列)、IP 番号 1~8 と IP 番号 9~16 (2 列)。
36. 洗浄したビーズに 100µl の **DNA purifying slurry** を直接添加し、Diagenode 社の **Magnetic Rack** から 8 連チューブをはずす。上下にピペティングしてミックスし、ChIP サンプル (ビーズと **DNA purifying slurry**) をラベルした新しい 1.5ml チューブに移す。
37. 100µl の **インプットサンプル** (ステップ 3、ポイント 24) をきれいな 1.5ml チューブに入れ、100µl の **DNA purifying slurry** を添加する。
38. チューブを転倒混和し、チューブクラップでチューブをロックする。

39. 沸騰浴で10分間、サンプルをインキュベートする。

----- ボイルしている間に、次のことを行う：-----

40. サーモミキサーのスイッチを入れ、温度を 55 にセットする。

41. キットに入っている *Proteinase K* を氷上で溶かす。

42. 新しい 1.5ml チューブにラベルする。IP 番号 1~8 (1列)、IP 番号 1~8 と IP 番号 9~16 (2列)。

----- 10分間のボイルが終わったら、次のポイントに進む：-----

43. 沸騰浴からチューブを取り出し (沸騰浴はまた必要になる)、蓋に付いた液体を落とすために軽くスピンする。

44. チューブクラップをはずす。サンプルが冷めるまで待つ。

45. 各サンプルに 1 μ l、インプットサンプルには 2 μ l の *Proteinase K* を添加する (フィルターチップを使用する)。

46. ミディアムパワーで2秒間ボルテックスする。

47. 55 のサーモミキサーで 1,000rpm、30分間、全てのサンプルを振とうする。

----- 30分間のインキュベーションが終わったら、次のポイントに進む：-----

48. 軽くスピンし、ボイルする前にチューブクラップでチューブをロックする。

49. 沸騰浴で10分間、サンプルをインキュベートする。

50. 4 で 14,000 \times g (12,000rpm)、1分間遠心する。

51. 沈殿を乱さないようにする。50 μ l の IP サンプルの上清と、150 μ l のインプットサンプルの上清を、ラベルした新しい 1.5ml チューブに移す (ポイント 42)。インプットサンプルの沈殿は捨てることができる。

52. IP サンプルの沈殿に 100 μ l の水を添加する。

53. ミディアムパワーで10秒間ボルテックスする。

54. 4 で 14,000 \times g (12,000rpm)、1分間遠心する。

55. 100 μ l の上清を集め、前の上清と合わせ、混合する。

ステップ 7. 定量PCRとデータ解析

1/ インプットサンプルを希釈 (1 : 100) する。

2/ 定量PCRミックスを調整する (total容量 25 μ l/反応)。

3/ PCRが終わったら、結果を解析する。

詳細はセクション 4. キットのアクセイプロトコール参照。

4. キットのアッセイプロトコール

注意事項

スターティングマテリアル-細胞と断片化クロマチン

1/ 細胞数：

細胞と実験に使用する細胞数はプロトコールに示す（表3）。

スケールによるが、各 ChIP には、1,000 細胞または 10,000 細胞からの断片化クロマチンが必要である（結果のセクションと表3参照）。

8 連チューブ 1 列使用すると 6 種類の抗体で、2 列使用すると 14 種類の抗体で ChIP を行える（それぞれ 1 回の解析に一つのネガティブ ChIP コントロールと一つのポジティブ ChIP コントロールを含む）。

例：10,000 細胞のような少量の細胞から、一度細胞のソニケーションの状態がわかっている場合、1 列使用して 8 IP が行える。

!!：全ての IP のために共通のクロマチンを調整する利点は、同じ細胞で異なるマーカー/修飾（いくつかの ChIP において）の解析を確実にすることである。

2/ 断片化の方法。プロトコールとキットの互換性。

細胞を回収した後、LowCell# Magnetic ChIP に使用する前にクロマチンを ~500bp に断片化しなければならない。本キットのプロトコールは、Bioruptor™ を使用するために至適化されていることに注意する。

Magnetic ChIP Kit には、断片化クロマチンを調整するためのバッファーが含まれている。

興味のあるターゲット、使える細胞数、PCR の数に依存する：130 µl の Buffer B に 10,000 から 1,000,000 細胞加える。スケールは調整する。

- Diagenode 社の Red ChIP Kit の断片化モジュール（Diagenode cat#：kch-redmod-100、kch-redmod-400）から得られた断片化クロマチンを使用することや、各自のプロトコールで断片化クロマチンを調整することもできる（“追加プロトコール”セクション参照）。
- 1 ChIP あたり、より多くのクロマチンを使用することは、PCR 解析の鋳型 DNA を増やす結果となる。それゆえ、各 ChIP に使用する細胞数を決定するときには、定量 PCR で評価したい遺伝子座の数を考慮することを推奨する。

3/ 断片化の至適化と断片化クロマチンの解析

ChIP を始める前に、あなたの特定の細胞タイプと固定のプロトコールのために断片化の条件を至適化する必要があるかもしれない。それゆえ、1) 少ないサンプル (1×10^5 から 1×10^6) で始める。2) 断片化の効率をチェックする。このマニュアルの“追加プロトコール”に断片化の短時間解析法のプロトコールが記載されている（他の選択肢として、Red ChIP Kit のマニュアル参照）。

4/ 断片化の装置。プロトコール間の互換性。

Diagenode 社のキットとプロトコールでは、Bioruptor™ を用いたクロマチンの断片化を取り入れている。バッファーの組成が適切で、効率的な断片化が得られるのであれば、他の超音波装置を用いることも可能である（“追加プロトコール”セクション参照）。

ステップ 1.抗体とmagnetic beadsの結合

この最初のステップは、抗体と Protein A-coated paramagnetic beads の結合からなる。

!! : ビーズは 4 での保存中と全ての操作の間において、懸濁液の状態を保つ。乾燥すると性能が低下する。

1. Protein A-coated paramagnetic beads を、氷冷した Buffer A で次のように 2 回洗浄する : Buffer A を添加し、Buffer A でビーズを懸濁する。次に、1,300rpm で 5 分間遠心し、上清を捨て、ビーズの沈殿を残す。

- ❖ 1 IP あたり 10 μ l のビーズが必要なことに注意する。スケールは調整する。
- ❖ 2 IP の場合 : 22 μ l のビーズのストック溶液に 55 μ l の Buffer A を添加する。
- ❖ 8 IP の場合 : 88 μ l のビーズのストック溶液に 220 μ l の Buffer A を添加する。
- ❖ 16 IP の場合 : 176 μ l のビーズのストック溶液に 440 μ l の Buffer A を添加する。

!! : ピペティングしてビーズが均一になるようにする。ビーズの量の変動すると再現性が低下する。

2. 洗浄の後、ストックと同じビーズ濃度になるように Buffer A で懸濁する。

- ❖ 2 IP の場合 : 22 μ l の Buffer A を添加 ; 8 IP の場合 : 88 μ l の Buffer A を添加 ; 16 IP の場合 : 176 μ l の Buffer A を添加
- ❖ ビーズの凍結厳禁。

!! : 各使用前にビーズを懸濁する。

3. 各 Magnetic CHIP 反応のために PCR チューブ (0.2ml) に 90 μ l の Buffer A を分注する。

- ❖ キットに入っている 8 連チューブを使用する。
- ❖ 一本ずつに分かれたチューブ (0.2ml) を使用することもできる。
- ❖ IP チューブにラベルする (1 IP あたり一本使用する : 例 : 1 列に IP 番号 1 から 8)。

4. IP チューブに、洗浄した Protein A-beads を 10 μ l 添加する。

5. 特異的な抗体とコントロールの抗体 (ポジティブとネガティブ) を添加する。

- ❖ 抗体は 1~3 μ g かそれ以上 (1 反応あたり 10 μ g まで) 添加する。使用する抗体に依存する。
- ❖ 抗体はビーズに結合する。
- ❖ トラブルシューティングガイド参照 : Protein A (及び G) の結合能力について。

6. 40rpm のローターで IP チューブを、4 で少なくとも 2 時間インキュベートする。
- ❖ 必要であれば、クロマチンサンプルの免疫沈降の準備ができるまでローターでインキュベーションする（次のステップ参照）。

ステップ 2. 細胞の回収と DNA-タンパク質のクロスリンク

ステップ 2 は、次のステップで断片化クロマチンを調整するための細胞の回収と固定からなる。

!! : 1 IP あたり必要な細胞数は表 3 に示す。この他に、断片化の効率を確認するために $10^5 \sim 10^6$ 細胞が必要であることを注意する。

!! : 他の指示がない限り sodium butyrate (終濃度 20mM) を全ての溶液に添加することに注意する。必要であれば他の阻害剤を使用する。

表 3 : 1 ChIP あたり必要な細胞数 (断片化の効率テストに必要な細胞は含まれていない)。

	1 ChIP あたり 必要な細胞数	6 ターゲット ChIP + ネガティブ IP コントロール + ポジティブ IP コントロール	14 ターゲット ChIP + ネガティブ IP コントロール + ポジティブ IP コントロール
.	100,000 細胞	800,000 細胞	1,600,000 細胞
.	10,000 細胞	80,000 細胞	160,000 細胞
.	1,000 細胞	8,000 細胞	16,000 細胞

7. 細胞を回収する前に、sodium butyrate (NaBu) の 1M ストック溶液を終濃度 20mM になるように培地に加え、穏やかに混合する。他の阻害剤を添加する。
8. 次のように細胞を調整する :
 - ❖ 室温に PBS を置いておく。以下のプロトコールはヒストン ChIP 用に NaBu-PBS を使用している。必要であれば、NaBu 及び/または、目的の ChIP に基づいて、必要な他の阻害剤を使用する。以下に記載している完全な PBS とは、阻害剤が入った PBS のことである。
 - ❖ **細胞が接着して増殖している場合**、死細胞を除くために培地を捨てる。10ml の完全な PBS を添加して細胞を洗浄する。阻害剤を入れたトリプシンでトリプシン処理をして、細胞を回収する。10ml の完全な PBS (室温) が入ったチューブに細胞を移し*、1,300rpm で 5 分間遠心する。細胞の沈殿を残して、上清を捨てる (*オプションとして、チューブに移す前に、血清と阻害剤 (20mM NaBu 及び/または、他の阻害剤) を含む培地を添加してトリプ

シンを不活化することができる。そして再び、培地を除くために完全な PBS で細胞を洗浄する。)。

- ❖ 細胞が浮遊して増殖している場合、1,300rpm で 5 分間遠心する。細胞の沈殿を残して、上清を捨てる。10ml の完全な PBS (室温、20mM sodium butyrate または他の阻害剤を含む) を添加して細胞を洗浄する。

9. 細胞をカウントする。例えば、約 200 μ l のサンプル中に含まれる細胞数を決定する。

10. 新しい 1.5ml チューブにラベルして、細胞を加えた後最終的に 500 μ l になるように、NaBu-PBS を添加する。次に、細胞を移してサンプル中で入念にピペットチップを洗浄する。

- ❖ 細胞を保護するために、1000 μ l のピペットチップか、口を広げるためにカットした、より小さいチップを使用する。

!! : この段階で、500 μ l 中に : 実験により、1,000,000 細胞、100,000 細胞または 10,000 細胞になっている。

11. サンプル 500 μ l あたり、36.6%ホルムアルデヒドを 13.5 μ l 添加する。

12. 穏やかにボルテックスして混合する。固定するために、室温で 8 分間インキュベートする。

13. サンプルに 1.25M Glycine を 57 μ l 添加する。

14. 穏やかにボルテックスして混合する。室温で 5 分間インキュベートする。これで固定を停止させる。

----- これ以降は氷上で操作する -----

15.4 で 470 \times g、10 分間、遠心する。

- ❖ 減速の設定をソフトにして、スイングアウトのローターを使用することを推奨する。

16. 上清をアスピレートする。細胞を除かないように注意する。ゆっくりとアスピレートし、溶液を約 30 μ l 残す。

- ❖ これがクロマチン断片化に使うクロスリンクした細胞である。直接ステップ 3 に進む。
- ❖ 沈殿を乱さないようにする。

ステップ 3.細胞の溶解とBioruptorによるクロマチンの断片化

このセクションは、細胞の溶解と Bioruptor によるクロマチンの断片化について記載している。この段階では、ChIP とそれに続く免疫沈降した DNA の PCR 解析に適したサイズの断片を作ることが重要である。平均サイズは 500bp である（範囲：200～1000bp）。

!!：使用前に Buffer B を室温に置いておく。

!!：他に指示がない限り、氷上で操作する。

17. クロスリンクした細胞を、0.5ml の氷冷した PBS (NaBu 及び/または、選んだ他の阻害剤を添加する) で 2 回洗浄する。

- ❖ NaBu-PBS を添加して、穏やかにボルテックスし、4 で 470 × g (減速の設定をソフトにしてスイングアウトのローターを使用する)、10 分間、遠心する。
- ❖ 100,000 細胞かそれ以上の場合、細胞を完全に洗浄するために、ピペットで懸濁する必要があるかもしれない。
- ❖ 細胞数が少ない場合、より容易に洗浄でき、ボルテックスで懸濁できる。
- ❖ どのような場合でも、次のポイントに進む前に、細胞が懸濁液であることを確かめる。

18. 最後の洗浄の後、上清をアスピレートする。溶液を 10～20 μl 残す。

- ❖ 材料がロスするので、除去しすぎないようにする。

19. Buffer B (室温) に Protease inhibitor と NaBu を添加する。これが完全な Buffer B である。バッファーは使用するまで室温に置いておき、その日に使わなかった分は捨てる。

20. 細胞に 130 μl の完全な Buffer B (室温) を添加する。懸濁するまでボルテックスする。氷上で 5 分間インキュベートする。

- ❖ これはクロマチン断片化前の、細胞の溶解ステップである。

21. サンプルは Bioruptor™ を使って、各 [30 秒間 “ON”、30 秒間 “OFF”] を 12 サイクルで超音波破碎して、クロマチンを断片化する。

- ❖ Bioruptor の取扱説明書に従う：簡潔に示す：予め氷で冷やしたウォーターバスから氷を取り除き、0 の水と少量のクラッシュアイスを加え、水位の印の所まで水を入れる。Bioruptor を “ハイパワー” にセットする。温度を 8 以下に保つため、4 サイクルごとに新しい 0 の水と氷で、徐々に温くなった水を取り換える。水を換えている間、サンプルは氷上に置いておく。

22. 断片化クロマチンはそのまま ChIP に使用する。

- ❖ このポイントで、断片化クロマチンはその後の ChIP 実験や断片化の効率の解析（解析ステップ）のために保存することもできる。
- ❖ または、130 μ l ずつ分けた断片化クロマチンを凍結チューブに移し、液体窒素で瞬間凍結して、-80 で保存する。
- ❖ ChIP のターゲットによっては、数週間または数ヶ月の間、クロマチンを液体窒素で保存できる。凍結融解しないこと。

23. Buffer A 1ml あたり 5 μ l の Protease Inhibitor mix を添加する。Buffer A に NaBu（終濃度 20mM）または他の阻害剤を添加する。

- ❖ これは次に使用する完全な Buffer A である。
- ❖ 1 サンプルあたり 870 μ l の完全な Buffer A が必要である。次のポイント参照。

24. 130 μ l の断片化クロマチンに、870 μ l の完全な Buffer A を添加する。

- ❖ この希釈のステップは、抗体を加える前に SDS の濃度を下げる（ \sim 0.1%）ために必要である。
- ❖ 1 サンプルあたりの細胞数を減らすために、サンプルをさらに希釈することもできる。
- ❖ 1,000 細胞のクロマチンは 1 ChIP 解析に十分である（ターゲットと使用する抗体に依存する）。

25. 解析ステップ。“追加プロトコール”セクション参照。断片化の効率を評価して、次のステップに進む。

9 IP+1 インプットサンプルに使用するクロマチンの量（次のステップ参照）。

- ❖ 1,000,000 細胞/ml の断片化クロマチン（1 IP あたり 100,000 細胞相当を使用するため）
または、100,000 細胞/ml の断片化クロマチン（1 IP あたり 10,000 細胞相当を使用するため）
または、10,000 細胞/ml の断片化クロマチン（1 IP あたり 1,000 細胞相当を使用するため）
- ❖ 1 反応あたりのインプットのために、ChIP 反応の際に使用されるのと同じ量のクロマチンサンプルを氷上に置いておく。
- ❖ 断片化効率の解析のために、100,000 細胞から 1,000,000 細胞のクロマチンを使用する。

ステップ 4 及び 5. Magnetic 免疫沈降と洗浄

ステップ 4 は、興味のあるタンパク質-DNA 複合体の免疫沈降と、免疫沈降された物質の洗浄からなる (ステップ 5)。

!! : IP には antibody-coated beads (ステップ 1、ポイント 6) と断片化クロマチン (ステップ 3、ポイント 24) を使用する。

26. 蓋についた溶液を落とすために、antibody-coated beads (ステップ 1、ポイント 6) の入った 0.2ml チューブを軽くスピンの。

27. チューブを氷冷した Magnetic Rack (予め氷上に置いて冷やしておく) に置き、1 分間待つ。

28. 上清を捨てる。antibody-coated beads の沈殿を残す。

29. 1 IP あたり 100 μ l の希釈した断片化クロマチンを使用する (ステップ 3、ポイント 24)。各 IP チューブ (0.2ml) に 100 μ l 移す。100 μ l をインプットサンプルとして、4 に保存する。

- ❖ .100 μ l の断片化クロマチンは 100,000 細胞から得られた。
- ❖ または .100 μ l の断片化クロマチンは 10,000 細胞から得られた。
- ❖ または .100 μ l の断片化クロマチンは 1,000 細胞から得られた。

30. チューブの蓋を閉め、磁場からチューブを取り出す。

31. 40rpm のローテーターで 2 時間から一晩、4 でインキュベートする。

- ❖ インキュベーション時間を短縮するために、超音波ウォーターバスを使用する場合は、“追加プロトコール” セクション参照。

次に :

----- 1 日目または 2 日目 -----

32. チューブを Magnetic Rack に置いて 1 分間待ち、バッファーを捨てる。100 μ l の氷冷した Buffer A で 3 回洗浄する。各洗浄は次のように行う : バッファーを添加、チューブの蓋を閉め、ビーズが懸濁するまで 8 連チューブを転倒混和し、ローテーター (40rpm) で 4 、

4 分間インキュベート、スピンして、Magnetic Rack に置いて 1 分間待ち、バッファーを捨てる。捕捉したビーズをキープする。

- ❖ チューブの壁に付いている捕捉されたビーズを捨てないようにする。
- ❖ Diagenode 社の Magnetic Rack に置く前に、蓋に付いた液体を落とすために、毎回チューブを軽くスピンする。
- ❖ 1.5ml チューブ用の Magnetic Rack を使用している場合、各洗浄には 150 μ l の Buffer A を使用する。

!! : [抗体-クロマチン-ビーズ]ミックスの洗浄は、抗体の結合したビーズに特異的に結合したクロマチン複合体を単離するために行う。

33. Buffer C で 1 回洗浄する : ビーズに 100 μ l の **Buffer C** を添加する。チューブの蓋を閉め、ビーズが懸濁するまで 8 連チューブを転倒混和し、ローテーター (40rpm) で 4 、4 分間インキュベートする。洗浄後にスピンして、Magnetic Rack にビーズの入ったチューブを置き、ビーズを捕捉して **Buffer C** を除く。

- ❖ 1.5ml チューブ用の Magnetic Rack を使用している場合、各洗浄には 150 μ l の Buffer C を使用する。
- ❖ クロマチン複合体は特異的にビーズに結合し、単離される。
- ❖ 室温で操作する。
- ❖ このステップ以降、フィルターチップを使用する。
- ❖ このステップ以降、キットに入っている PCR-grade water を使用する。

!! : 洗浄したビーズから、結合した DNA を精製する (次のポイントに進む)。

ステップ 6. DNA精製

このステップの目的は、免疫沈降したクロマチンからDNAを単離することである。

34. 沸騰浴を準備する。

35. 新しい 1.5ml チューブにラベルする。IP 番号 1~8 (1 列)、IP 番号 1~8 と IP 番号 9~16 (2 列)。

36. 洗浄したビーズに 100 μ l の DNA purifying slurry を直接添加し、Diagenode 社の Magnetic Rack から 8 連チューブをはずす。上下にピペティングしてミックスし、ChIP サンプル (ビーズと DNA purifying slurry) を、ラベルした新しい 1.5ml チューブに移す。

❖ スラリーは懸濁した状態で分注する。

❖ フィルターチップを使用する。チップは切断して使用しても良い。

❖ きれいな 1.5ml チューブに ChIP マテリアルを移すときは、各チューブに分注する前に、上下にピペティングする。

37. 100 μ l の インプットサンプル (ステップ 3、ポイント 24) をきれいな 1.5ml チューブに入れ、100 μ l の DNA purifying slurry を添加する。

38. チューブを転倒混和し、チューブクラップでチューブをロックする。

39. 沸騰浴で 10 分間、サンプルをインキュベートする。

----- ボイルしている間に、次のことを行う： -----

40. サーモミキサーのスイッチを入れ、温度を 55 にセットする。

41. キットに入っている **proteinase K** を氷上で溶かす。

42. 新しい 1.5ml チューブにラベルする。IP 番号 1~8 (1 列)、IP 番号 1~8 と IP 番号 9~16 (2 列)。

-----10 分間のボイルが終わったら、次のポイントに進む： -----

43. 沸騰浴からチューブを取り出し (沸騰浴はまた必要になる)、蓋に付いた液体を落とすために軽くスピンする。

44. チューブクラップをはずす。サンプルが冷めるまで待つ。
45. 各サンプルに 1 μ l、インプットサンプルには 2 μ l の proteinase K を添加する（フィルターチップを使用する）。
46. ミディアムパワーで 2 秒間ボルテックスする。
47. 55 のサーモミキサーで 1,000rpm で、30 分間、全てのサンプルを振とうする。
- 30 分間のインキュベーションが終わったら、次のポイントに進む：-----
48. 蓋に付いた液体を落とすために軽くスピンス、チューブクラップでチューブをロックする。
49. 沸騰浴で 10 分間、サンプルをインキュベートする。
50. 4 で 14,000 \times g (12,000rpm)、1 分間遠心する。
51. 沈殿を乱さないようにする。50 μ l の IP サンプルの上清と、150 μ l のインプットサンプルの上清を、ラベルした新しい 1.5ml チューブ（ポイント 42）に移す。インプットサンプルの沈殿は捨てることができる。
52. IP サンプルの沈殿に 100 μ l の水を添加する。
53. ミディアムパワーで 10 秒間ボルテックスする。
54. 4 で 14,000 \times g (12,000rpm)、1 分間遠心する。
55. 100 μ l の上清を集め、前の上清（ポイント 51）と合わせ、混合する。
各サンプル（インプットと IP）の**トータル容量**は 150 μ l である。
- ❖ ChIPサンプルとインプットサンプルからDNAが精製され、PCRで解析するための準備ができた。
 - ❖ すぐにPCRステップに進む、または全てのサンプルを凍結する。
 - ❖ - 20 で保存する。

ステップ 7. 定量PCRとデータ解析 s

この最後のステップは、免疫沈降したDNAの増幅と解析からなる。

1/ インプットサンプルを次のように希釈 (1 : 100) する :

1 μ l の精製したDNA (インプット) に 99 μ l の水を加える。

2/ SYBR Green の PCR マスターミックスを使って、**定量 PCR ミックス**を調整する。**定量 PCR サイクル**は下に示す。

定量PCRミックス (トータル容量 25 μ l / 反応) :

- 1 μ l の提供されたプライマーペア (ストック : 各 5 μ M : リバースとフォワード)
- + 12.5 μ l のマスターミックス (例 : iQ SYBR Green supermix)
- + 5.0 μ l の精製したDNAサンプルまたは希釈したインプットサンプル (上記インプットの希釈)
- + 6.5 μ l の水

定量PCRサイクル :

	温度	時間	サイクル数
PCR 増幅	95	3 分間	$\times 1$
	95	30 秒間	$\times 40$
	60	30 秒間	
	72	30 秒間	
融解曲線	65 で 1 サイクルごとに 0.5 ずつ上昇	1 分間	$\times 60$

3/ PCRが終わったら、結果を**解析する**。いくつかの主要なアドバイスを以下に示す。

❖ **プライマー設計**

- _ プライマーの自己相補性及び二次構造は、primer design (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) でテストできる。定量PCRプライマー用には、アニーリング温度 60 を推奨する。
- _ 短い断片 (50 ~ 150bp) は PCR の効率を促進し、G/C リッチ領域の増幅に潜在する問題を減少させる。
- _ フォワードプライマーとリバースプライマーの融解温度の差は、2 ~ 3 を超えないようにする。
- _ プライマーの 3' 末端の G/C 構造は避けるべきである。

❖ **定量 PCR の利点**

定量 PCR やリアルタイム PCR は、信頼性のある定量結果を短時間で得ることができる。次のウェブページを参考にする : <http://www.gene-quantification.info/> 。この Gene-Quantification のページには、リアルタイム定量 PCR 及び定量 RT-PCR を使った遺伝子発現定量解析における、技術面の要約が掲載されており、アプリケーション、ケミストリー、方法、アルゴリズム、サイクル、キット、色素、解析方法、学会、ワークショップ、サービス等のたくさんの情報がある。

❖ プライマーの確認

- _ プライマーセットをsilico PCR (<http://genome.cse.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>) でテストする。プライマーは、ゲノムから唯一のDNAを増幅すべきである。
- _ インプットDNAの10倍希釈系列を使って、定量PCRで全てのプライマーセットをテストし、次の式を使って増幅効率(AE)を算出する⁽⁵⁾： $AE = 10^{-1/\text{傾き}}$
- _ 理想的な増幅ファクターは2である。問題がない場合でも、異なるブランドの定量PCR試薬や新しいプライマーについてはテストすべきである。
- _ 定量PCRでの融解曲線解析が、プライマーダイマーや非特異的産物をいつも見つけれられるわけではないので、定量PCR産物を高分離のアガロースゲルで泳動もすべきである。

❖ データの解釈

特定遺伝子座のクロマチン免疫沈降の効率は、スターティングマテリアルのパーセンテージとして定量PCRのデータから計算することができる： $\%(\text{ChIP}/\text{トータルインプット})$

$$\%(\text{ChIP}/\text{トータルインプット}) = 2^{\wedge}[(\text{Ct}^{(\text{x}\% \text{インプット})} \log(\text{x}\%)/\log 2) - \text{Ct}^{(\text{ChIP})}] \times 100\%$$

ここでの2は、上で算出した増幅効率(AE)である⁽⁵⁾； $\text{Ct}^{(\text{ChIP})}$ と $\text{Ct}^{(\text{x}\% \text{インプット})}$ は、免疫沈降DNAサンプルとインプットサンプルそれぞれの定量PCRの指数増幅段階から得られたスレッシュホールド値である；補正因子 $(\log \text{x}\% / \log 2)$ はインプットの1:x希釈を考慮するために使われる。

回収率は、 $\%(\text{ChIP}/\text{トータルインプット})$ である。

または

$$\% \text{ インプット} = AE^{\wedge}(\text{Ct}^{\text{インプット}} - \text{Ct}^{\text{ChIP}}) \times F_d \times 100\%$$

ここでのAEは先に計算した増幅効率である⁽⁵⁾； Ct^{ChIP} と $\text{Ct}^{\text{インプット}}$ は、定量PCRの指数増幅段階から得られたスレッシュホールド値である； F_d は定量PCRに使ったChIP DNAとインプットDNAの量の差のバランスを取るためのインプットDNAの希釈係数である。

❖ *Relative occupancy*はバックグラウンド上の特定シグナルの割合として計算される。

$$\text{Occupancy} = \% \text{ インプット (特異的遺伝子座)} / \% \text{ インプット (バックグラウンド遺伝子座)}$$

*Relative occupancy*は、特定の遺伝子座に結合するタンパク質の尺度として使用される；これはChIPの特異性についての手がかりとなる。特異性の高いChIPはバックグラウンドに対して約10倍量の結果を生じ、中には1000倍量に達する抗体もある。この値は抗体だけでなく、ターゲットにも依存する。ChIPの結果は、効率と特異性の両方が有意な値の場合に信頼できると考えられる。

❖ 断片化したゲノムDNAで作った検量線を利用する。希釈系列を作り、ChIPに使ったプライマーで定量PCRを行う。これでPCRの効率が見える。多くの定量PCRのプログラムは、スタンダードの既知のDNA量とCtを比較して、サンプル中のDNA量を自動的に計算する。

補注：データ解析

検量線を利用する。

検量線は断片化したゲノム DNA から作られる。同じ種や同じ細胞タイプから DNA を調整することを推奨する。ChIP サンプルの濃度範囲をカバーする希釈系列を作る。広範囲に 8 種類の濃度を作る。定量 PCR のプログラムは、Ct と既知の DNA 量を比較してサンプルの量を自動的に計算してくれる。

生データ (スタンダード、インプットとIP)

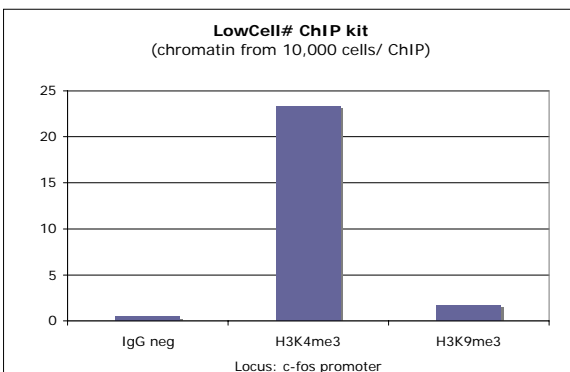
	スタート量 (SQ, ng)	Ct値
スタンダード 1	2.01E+00	27.98
スタンダード 2	1.0E+00	29.14
スタンダード 3	5.17E-01	30.38
スタンダード 4	2.59E-01	31.89
スタンダード 5	1.51E-01	32.31
スタンダード 6	1.23E-02	34.65
スタンダード 7	2.17E-02	34.75
スタンダード 8	9.58E-03	35.83

識別名	スレッシュホールド サイクル(Ct)	スタート量 (SQ)	スタート量の平均
インプット 1/100	34.68	1.95E-02	1.25E-01
インプット 1/100	31.36	2.30E-01	1.25E-01
IgG	33.36	5.20E-02	5.47E-02
IgG	33.23	5.74E-02	5.47E-02
H3K4me3	27.86	3.09E+00	2.92E+00
H3K4me3	28.02	2.75E+00	2.92E+00
H3K9me3	31.26	2.48E-01	2.09E-01
H3K9me3	31.76	1.71E-01	2.09E-01

計算：% of インプット = IPの量 / インプット (1%) の量

IgG	H3K4me3	H3K9me3
0.44	23.36	1.67

グラフ (% of インプット)



ChIPの結果を示すために検量線を利用。

ChIP 解析は、Diagenode 社の LowCell# ChIP Kit (Diagenode cat#: kch-mahlow-016、NIPPON GENE Code No.: 311-80761) と分化していないヒト奇形癌 (NCCIT) 細胞を使って行われた。Diagenode 社の antibodies directed against H3K4me3 (Diagenode cat#: pAb-003-024、NIPPON GENE Code No.: 317-80501) と against H3K9me3 (Diagenode cat#: pAb-056-050、NIPPON GENE Code No.: 314-80631) と同様、免疫沈降された DNA の c-fos プロモーター領域を増幅するために至適化された定量 PCR プライマー (Diagenode cat#: pp-1004-050、-500) も使用した。クロマチンは 100,000 細胞を断片化した (ステップ 3)。1 ChIP 実験あたり、10,000 細胞のクロマチンと 1 µg の抗体を使用した (ステップ 4)。ChIP 解析はネガティブコントロール抗体を含む (negative IgG from rabbit: 1 µg/IP)。データを示すために検量線が使われた。

II. 直接Ct値を利用する（検量線を使わない）。

定量PCRは、検量線を使わないステップ 7（定量PCRとデータ解析）で示したように行い、Ct値を3つの表に示した（下の生データ参照）。補正因子（ $\log(100)/\log 2$ ）は100%インプットのCt値を計算するために、希釈したインプット（1%）のCt値から引かれる。

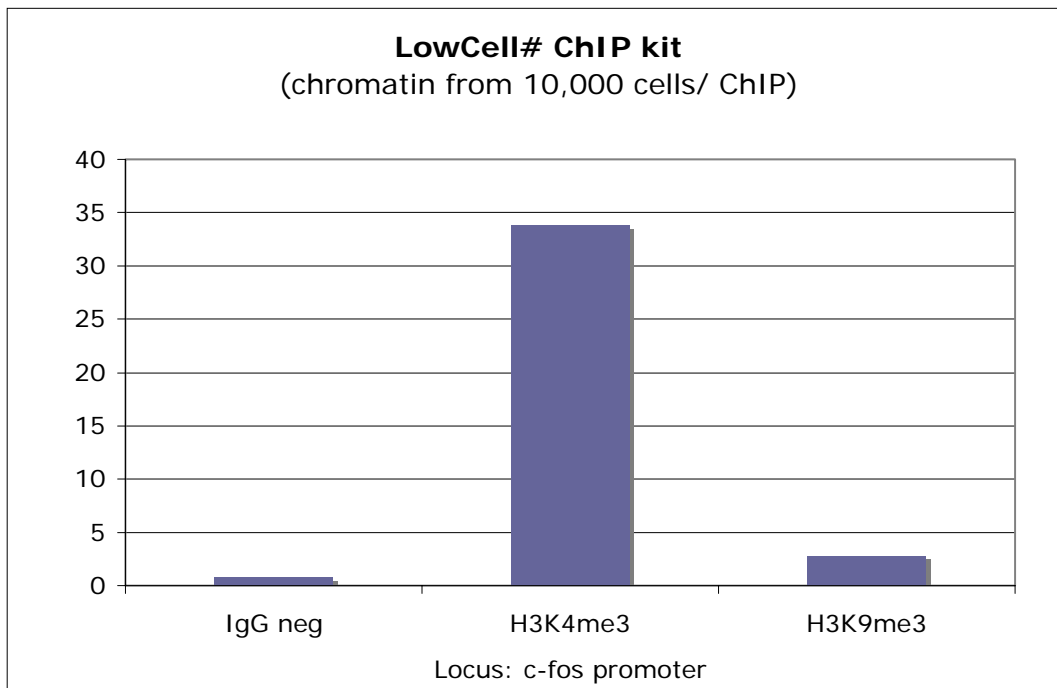
生データ（Ct値）

Ct インプット 1/100 平均値	補正因子	Ct インプット 100%	Ct IgG 平均値
33.0	6.6	26.4	33.3
Ct インプット 1/100 平均値	補正因子	Ct インプット 100%	Ct H3K4me3 平均値
33.0	6.6	26.4	27.9
Ct インプット 1/100 平均値	補正因子	Ct インプット 100%	Ct H3K9me3 平均値
33.0	6.6	26.4	31.5

$$\text{計算：\% (ChIP / トータルインプット)} = 2^{\wedge} [(Ct^{(x\% \text{インプット})} \log(x\%)/\log 2) - Ct^{(ChIP)}] \times 100\%$$

IgG	H3K4me3	H3K9me3
0.8	33.8	2.8

グラフ（% of インプット）

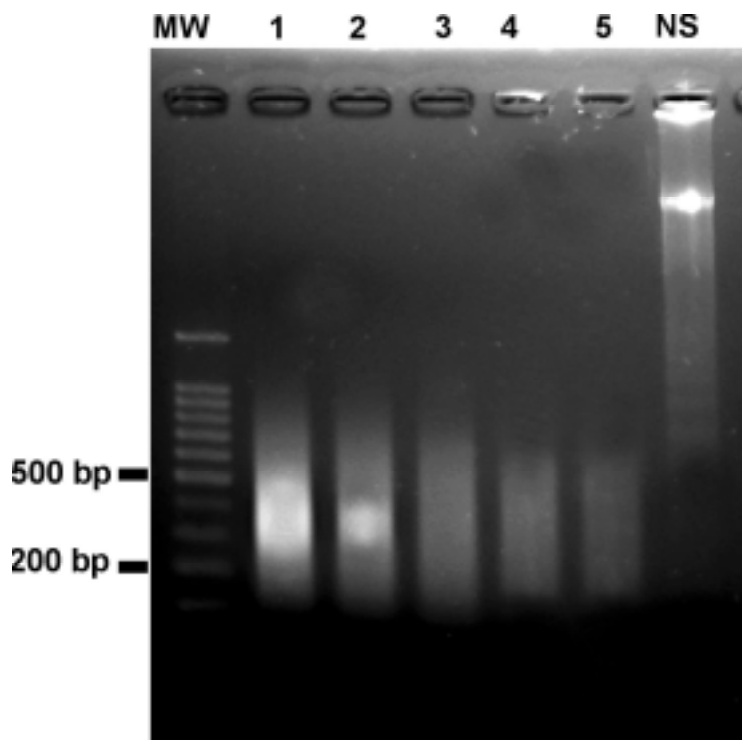


検量線を使わないChIP結果の解析

ChIP解析は、Diagenode社のLowCell# ChIP Kit（Diagenode cat#: kch-mahlow-016、NIPPON GENE Code No.: 311-80761）と、分化していないヒト奇形癌（NCCIT）細胞を使って行われた。Diagenode社のantibodies directed against H3K4me3（Diagenode cat#: pAb-003-024、NIPPON GENE Code No.: 317-80501）とagainst H3K9me3（Diagenode cat#: pAb-056-050、NIPPON GENE Code No.: 314-80631）と同様、免疫沈降されたDNAのc-fosプロモーター領域を増幅するために至適化された定量PCRプライマー（Diagenode cat#: pp-1004-050、-500）も使用された。クロマチンは100,000細胞を断片化した（ステップ 3）。1 ChIP実験あたり：10,000細胞のクロマチンと1μgの抗体を使用した（ステップ 4）。ChIP解析はネガティブコントロール抗体を含む（negative IgG from rabbit: 1μg/IP）。

Diagenode 社 LowCell# ChIP 結果

図 1 : Magnetic ChIP のための断片化クロマチンの解析

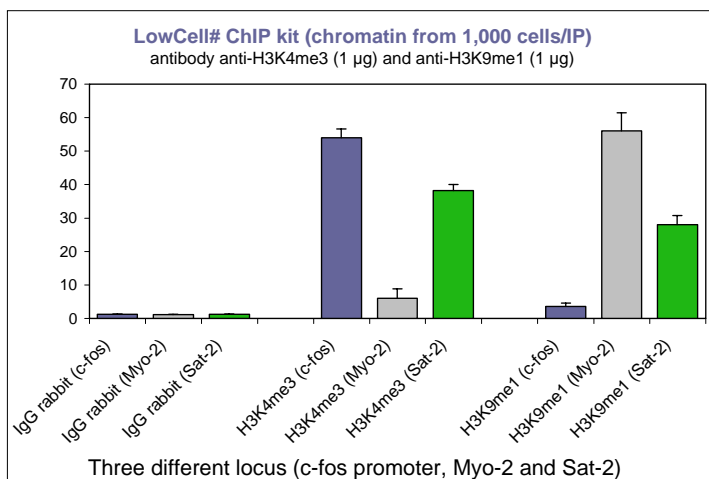
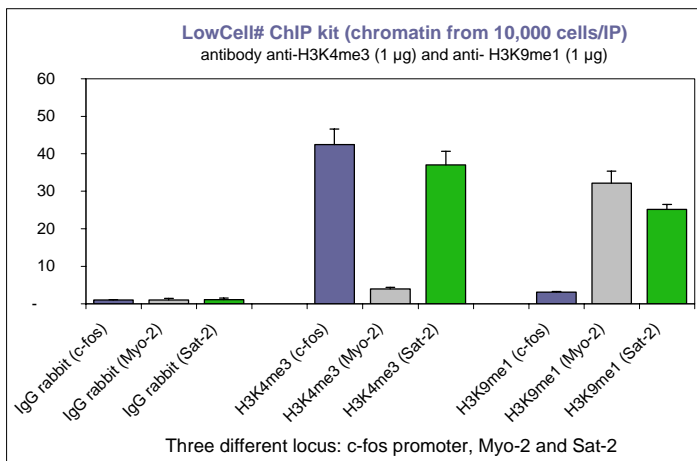
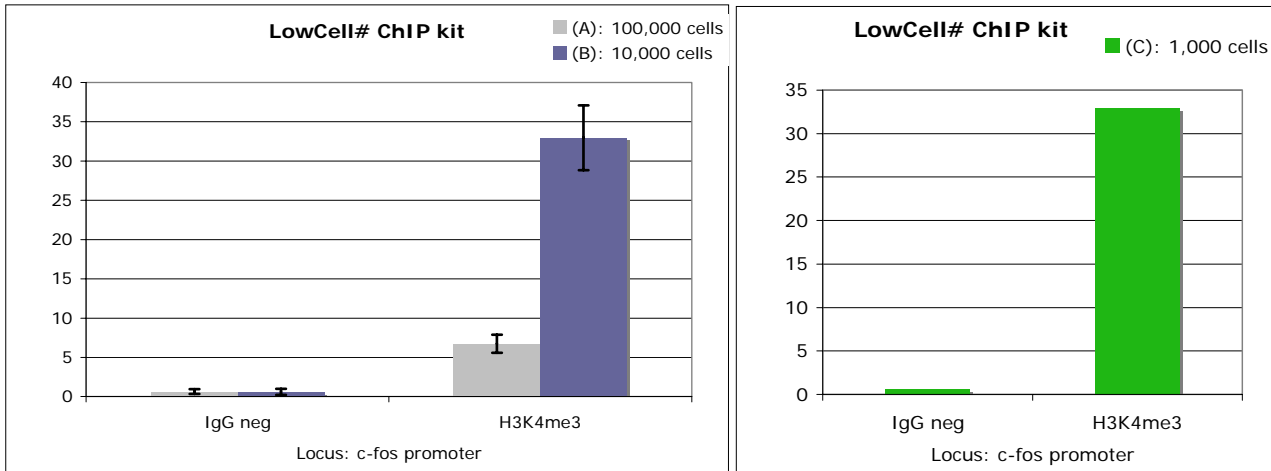


Diagenode 社の LowCell# ChIP Kit の断片化プロトコールで得られた断片化クロマチンから単離した DNA のアガロースゲル解析。

ヒト乳癌 MCF7 細胞を 1% ホルムアルデヒドで固定した (室温、8 分間)。1,000,000 細胞 (レーン 1)、750,000 細胞 (レーン 2)、500,000 細胞 (レーン 3)、100,000 細胞 (レーン 4、5) の断片化クロマチンをゲルで解析した。

1,000,000 細胞 (レーン 1、2、3、4) または 100,000 細胞 (レーン 5) をクロマチン断片化の前に、130 μ l の Buffer B に懸濁した。サンプルは Diagenode 社の Bioruptor™ (Diagenode cat#: UCB-200) を用いて、[30 秒 “ON” / 30 秒 “OFF”] を 12 サイクルで断片化した。断片化の効率は Magnetic ChIP の前に評価した (“断片化の解析ステップ” 参照)。断片化クロマチンから単離した DNA 10 μ l を、1.5% アガロースゲルで解析した。左のレーンは 100bp DNA 分子量マーカー (MW) で、右のレーンは断片化していない DNA である (NS)。

図 2 : LowCell# Magnetic ChIP を 1 IP あたり異なる細胞数で行った (細胞数の down-titration) :



Diagenode 社の Magnetic ChIP プロトコールでの細胞の Down-titration

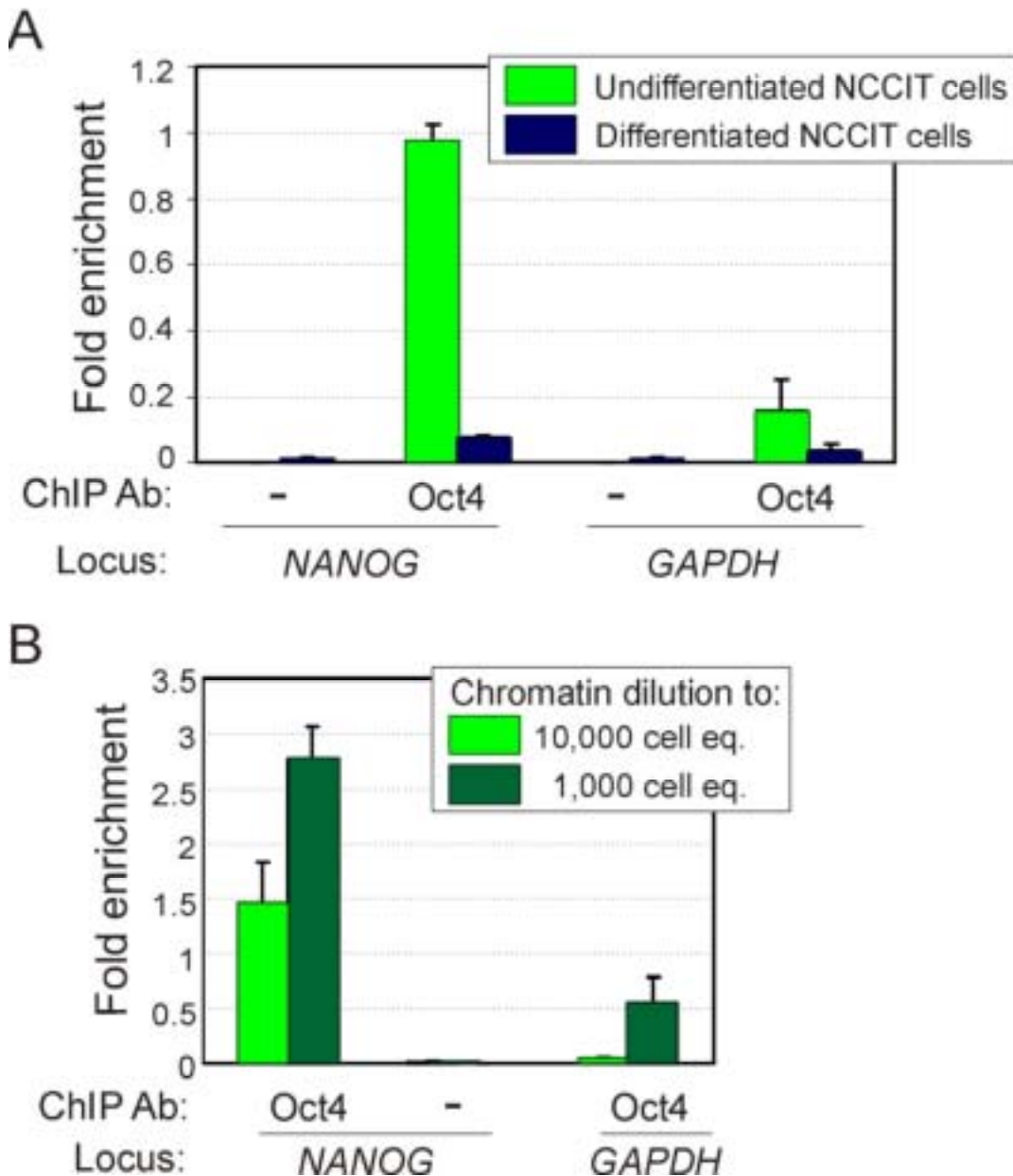
上のパネル : ChIP 解析は、Diagenode 社の LowCell# ChIP Kit (Diagenode cat#: kch-mahlow-016、NIPPON GENE Code No. : 311-80761) と NCCIT 細胞を用いて行われた。Diagenode 社の antibodies directed against H3K4me3 (Diagenode cat#: pAb-003-024、NIPPON GENE Code No. : 317-80501) と免疫沈降された DNA の c-fos promotor 領域を増幅するために至適化された定量 PCR プライマー (Diagenode cat#: pp-1004-050、-500) も使用した。

クロマチンは1,000,000細胞を断片化し (ステップ 3)、1 ChIPあたり100,000細胞相当を使用した (ステップ 4) (A 参照)。他の2つの実験では、クロマチンは100,000細胞を断片化し (ステップ 3)、1 ChIPあたり10,000 (B) または1,000 (C) 細胞相当を使用した (ステップ 4)。1 ChIP実験あたり1 µgの抗体を使用した。ChIP解析はネガティブコントロール抗体を含む (1 µg/IP)。再現性が示され、ChIPは1,000/IPのような少量の細胞で行うことができた。4つの独立した実験の結果がAとBに示されている。

中央と下のパネル : ChIP解析はDiagenode社の antibodies directed against H3K9me1 (Diagenode cat#: pAb-065-100) と免疫沈降

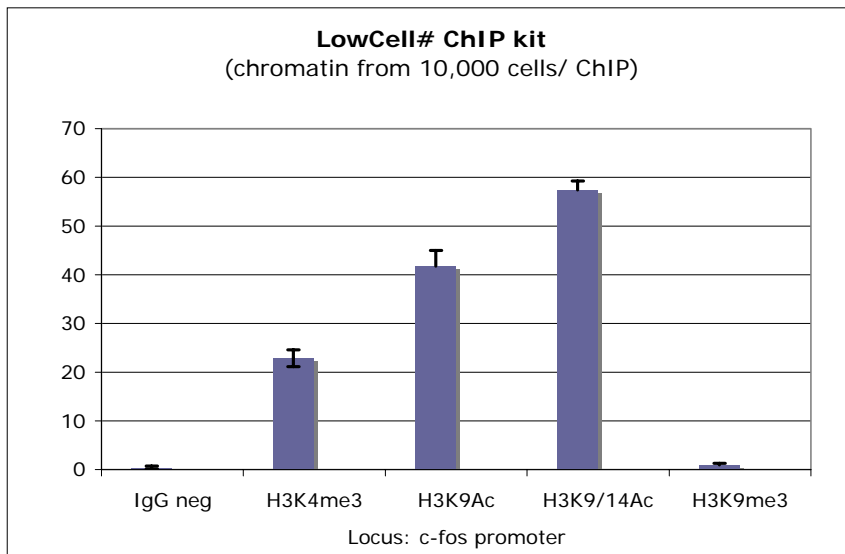
されたDNAの3つの異なる領域を増幅するために至適化された定量PCRプライマー用いて行われた : c-fos promotor、Myoglobin exon2 (Diagenode cat#: pp-1006-050、-500)、Sat-2(Diagenode cat#: pp-1040-050、-500)。1 ChIPあたり : 10,000細胞 (中央) または1,000細胞 (下のパネル) からのクロマチンと1 µgの抗体を用いた。ChIP解析はネガティブコントロール抗体を含む (1 µg negative IgG from rabbit /IP)。各ChIP解析は3連で行われた。

図3：異なる細胞タイプと細胞数で、LowCell# Magnetic ChIPを行った（細胞数の down-titration）：



ChIP解析は、Diagenode社のLowCell# ChIP Kit (Diagenode cat#: kch-mahlow-016、NIPPON GENE Code No.: 311-80761)、NCCIT細胞、抗Oct4抗体、免疫沈降されたDNAの特定の座位を増幅するために至適化された定量PCRプライマーペア (NANOGとGAPDH) を用いて行われた。A. ChIP解析は10,000細胞のクロマチンを用いて行われた：分化していないNCCIT細胞か、分化しているNCCIT細胞（それぞれ、明るい緑と濃い青）。B. 1 ChIPあたり10,000または1,000の分化していない細胞（それぞれ、明るい緑と濃い青）のクロマチンが使われた。ChIP解析はネガティブコントロール抗体を含む。再現性が示され、ChIPは1,000/IPのような少量の細胞で行うことができた。4つの独立した実験の結果を示す。結果はPhilippe Collasの研究室で得られた (Freberg, Dahl, Timoskainen and Collas, 2007; Dahl and Collas, 2007改変)。

図4：一連の修飾ヒストンのLowCell# Magnetic ChIP解析

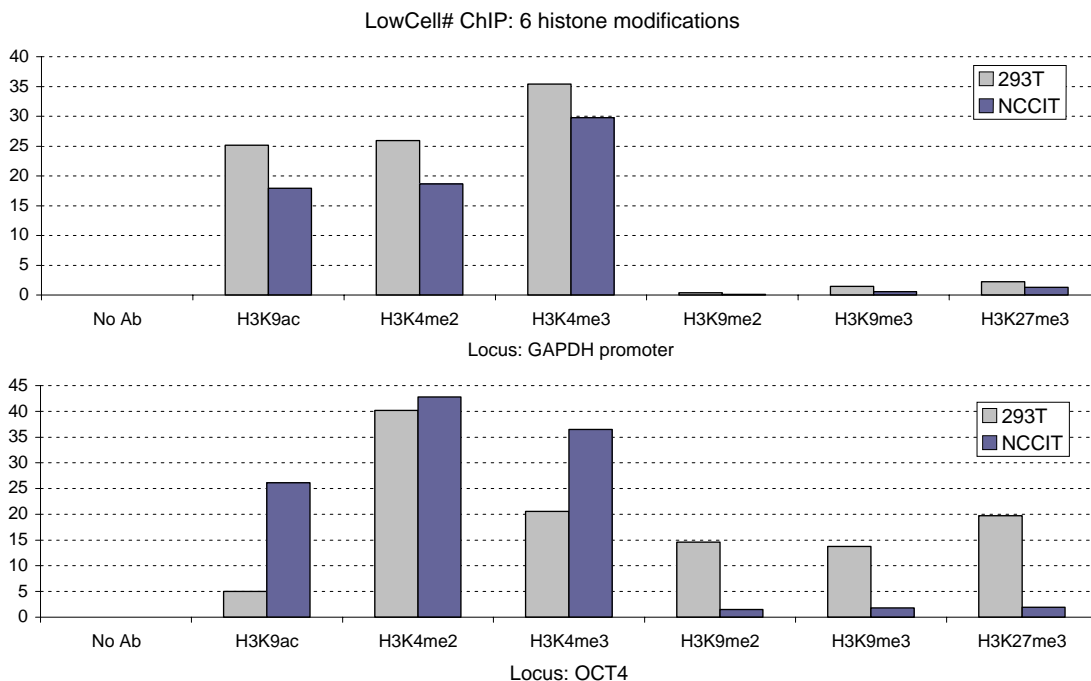


Diagenode社のMagnetic ChIP Kitは、同じクロマチンサンプルで、一連の抗体（8または16）を研究するのに適している。

ChIP解析は、LowCell# ChIP Kit、分化していないヒト奇形癌（NCCIT）細胞、Diagenode社のantibody directed against: H3K4me3 (Diagenode cat#: pAb-003-024、NIPPON GENE Code No. : 317-80501)、H3K9ac (Diagenode cat#: pAb-004-044、NIPPON GENE Code No. : 314-80511)、H3K9/14ac (Diagenode cat.# : pAb-005-044、NIPPON GENE Code No. : 311-80521)とH3K9me3 (Diagenode cat#: pAb-

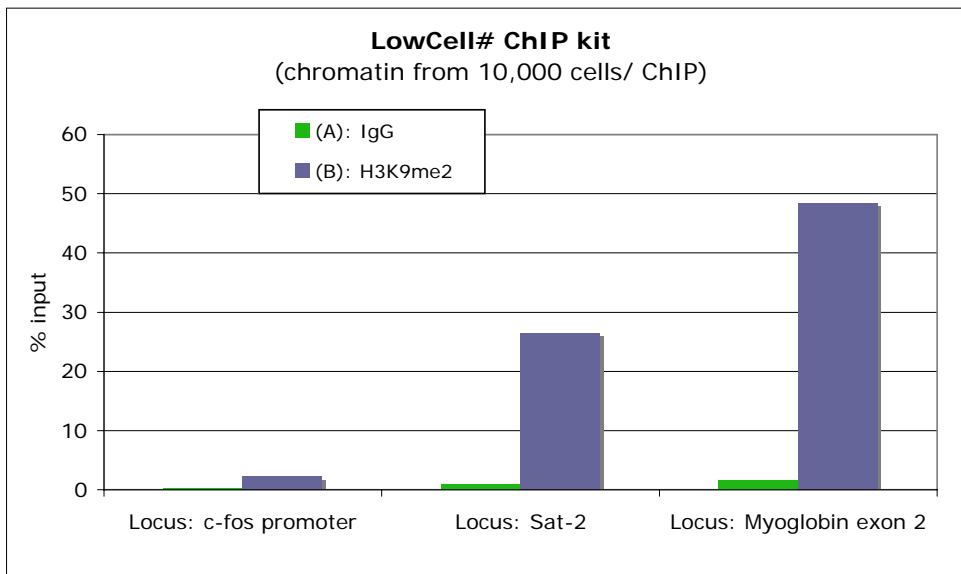
056-050、NIPPON GENE Code No. : 314-80631)を用いて行われた。免疫沈降されたDNAのc-fos promoter領域を増幅するために至適化された定量PCRプライマーペアが用いられた。クロマチンは100,000細胞を断片化した。1 ChIPあたり10,000細胞のクロマチンと1 µgの抗体を使用した。ChIP解析はネガティブコントロール抗体を含む(1 µg/IP)。3つの独立した実験の結果を示す。

図5：異なる細胞タイプにおける一連の修飾ヒストンのLowCell# Magnetic ChIP解析



ChIP解析は、LowCell# ChIP Kit、NCCIT細胞、293T細胞、修飾ヒストン抗体を用いて行われた。免疫沈降されたDNAの、GAPDH promoterとOCT4領域を増幅するために至適化された定量PCRプライマーを使用した。クロマチンは100,000細胞を断片化した。1 ChIPあたり10,000細胞相当と2.5 µgの抗体を使用した。ChIP解析はネガティブコントロール抗体を含む(2.5 µg/IP)。結果はPhilippe Collasの研究室で得られた(Freberg, Dahl, Timoskainen and Collas, 2007; Dahl and Collas, 2007改変)。

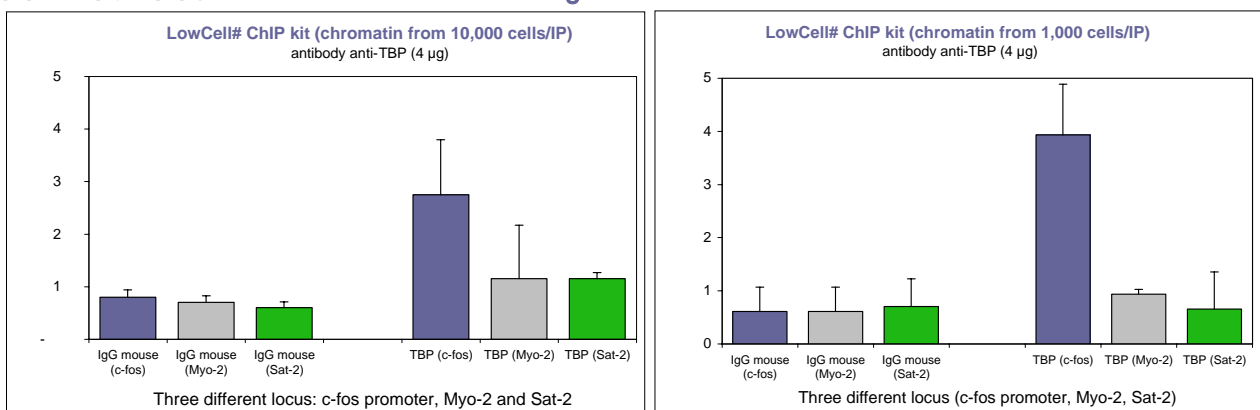
図 6 : 一連の異なるゲノム領域の LowCell# Magnetic ChIP 解析



ChIP 解析は、LowCell# ChIP Kit、NCCIT 細胞、アフィニティー精製した antibody directed against H3K9me2 (Diagenode cat#: pAb-060-050、NIPPON GENE Code No.: 316-80691) と至適化された定量 PCR プライマーペアが用いられた。1 ChIP 実験あたり 10,000 細胞の断片化クロマチンと、1 µg の抗 H3K9me2 抗体を使用した。IgG (1 µg/IP) はネガティブコントロール

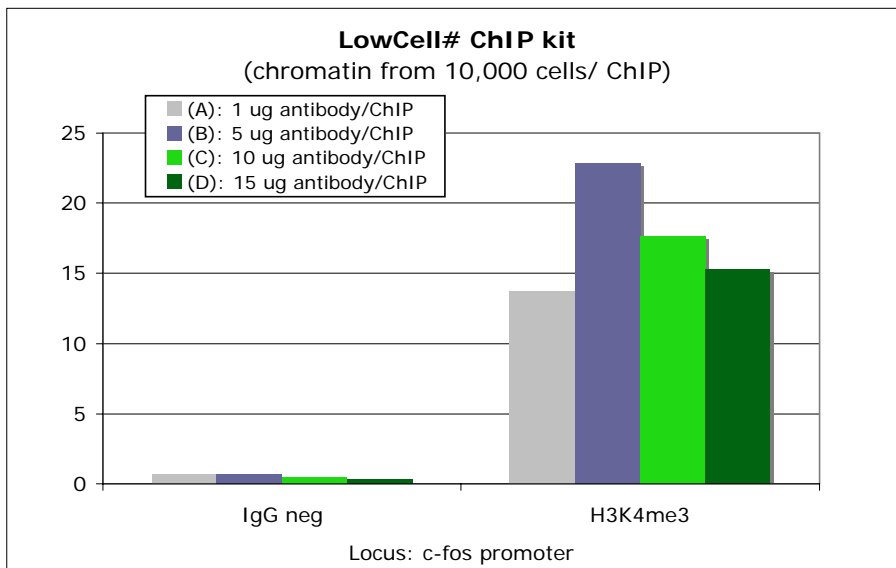
抗体として用いられた。H3K9 のメチル化はサイレントな領域に関係がある。それゆえ、ネガティブ PCR コントロールとして、活発に転写されているハウスキーピング遺伝子: c-fos のプロモーターを用いた。ヘテロクロマチンにある Sat-2 と、不活性なクロマチンにある Myoglobin exon 2 はポジティブ PCR コントロールとして用いられる。回収率(% of インプット)を上を示す。回収率の%はインプット DNA に対する免疫沈降された DNA の相対量を表す。ネガティブ IP コントロールは、全てのプライマーペアで低い回収率になる(バー1、3、5)。ネガティブプライマーペア: 'c-fos promoter' (バー2) に比べてポジティブプライマーペア: 'Sat-2' (バー4) と 'Myoglobin exon 2' (バー6) を用いた時の回収率は高い。

図 7 : 転写因子 LowCell# ChIP : TBP Magnetic ChIP



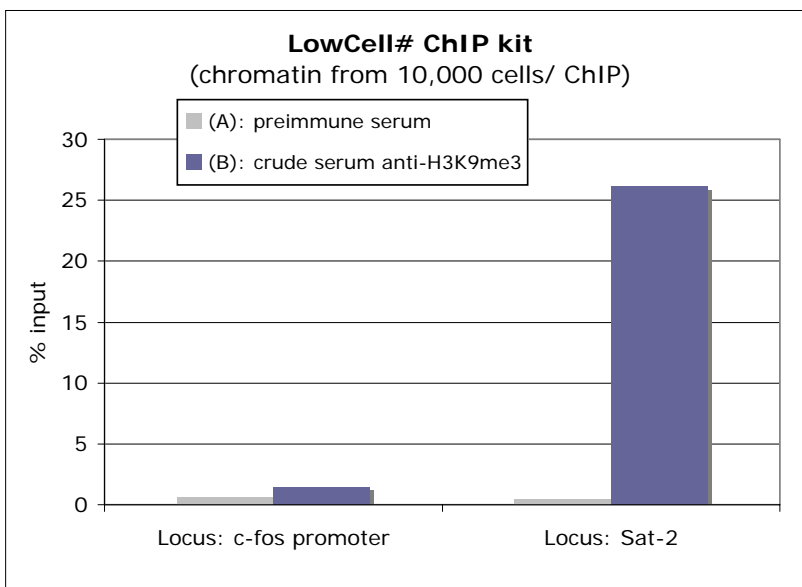
ChIP 解析は、LowCell# ChIP Kit、分化していないヒト奇形癌 (NCCIT) 細胞、Diagenode 社の antibody directed against TATA box binding protein (TBP) (Diagenode cat.#: MAb-002-100、NIPPON GENE Code No.: 314-80491) と免疫沈降された DNA の 3 つの異なる座位: c-fos promoter 領域 (cat#: pp-1004-050、-500)、Myoglobin exon 2 (Diagenode cat#: pp-1006-050、-500) と Sat-2 (Diagenode cat#: pp-1040-050、-500) を増幅するために至適化された定量 PCR プライマーペアを用いて行われた。1 ChIP あたり: 10,000 細胞 (左のパネル) または 1,000 細胞 (右のパネル) のクロマチンと 4 µg の抗体を使用した。ChIP 解析はネガティブコントロール抗体を含む (4 µg negative IgG from mouse / IP)。各 ChIP 解析は 3 連で行われた。

図 8 : LowCell# ChIP 抗体 titration の例



ChIP解析は、LowCell# ChIP Kit、分化していない奇形癌（NCCIT）細胞、アフィニティー精製したantibody directed against H3K4me3（Diagenode cat# : pAb-003-024、NIPPON GENE Code No. : 317-80501）と、免疫沈降されたDNAから定量PCRによってc-fos promoter領域を増幅するために至適化された定量PCRプライマーペア（Diagenode cat# : pp-1004-050、-500）を用いて行われた。1 ChIPあたり、10,000細胞のクロマチンと異なる量の抗H3K4me3抗体（1 μg、5 μg、10 μg、15 μg）を使用した。ChIP解析には同じ量のネガティブコントロール抗体（1 μg、5 μg、10 μg、15 μg）が含まれる（negative rabbit IgG）。

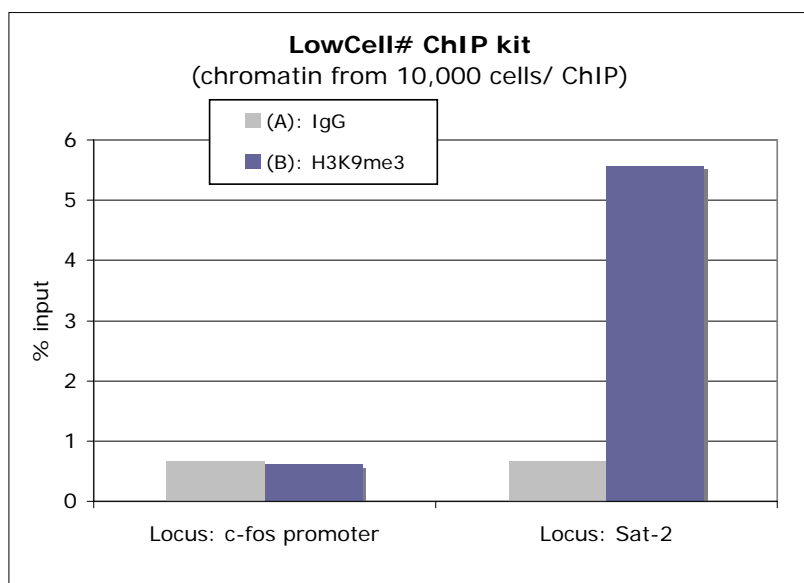
図 9 : crude serum を用いた LowCell# ChIP Kit



ChIP 解析は、LowCell# ChIP Kit、分化していないヒト奇形癌（NCCIT）細胞、Diagenode 社の crude serum directed against H3K9me3（Diagenode cat# : CS-056-050、NIPPON GENE Code No. : 311-80641）と、定量 PCR のために至適化された PCR プライマーペアを用いて行われた。1 ChIP 実験あたり、10,000 細胞のクロマチンが用いられた。免疫前の血清と crude serum directed against H3K9me3 は 5,000 倍希釈して用いた。免疫前の血清はネガティブ IP コントロールとして用いられる。H3K9me3 はヘテロクロマチンのマーカーである。それゆえ、

ネガティブ PCR コントロールとして、活発に転写されているハウスキーピング遺伝子 c-fos のプロモーターを用いた。ヘテロクロマチンにある Sat-2 は、ポジティブ PCR コントロールとして用いられる。抗 H3K9me3 抗血清で得られる回収率（% of インプット）は、ネガティブ PCR コントロールとしての c-fos promoter のプライマーペアと、ポジティブ PCR コントロールとしての Sat-2 のプライマーペアを用いて示される（B）。免疫前の血清の回収率も、c-fos promoter と Sat-2 のプライマーペアを用いて示される。両方ともネガティブターゲットになる（A）。回収率の%は、定量 PCR 解析後のインプット DNA に対する免疫沈降された DNA の相対量を表す。抗体は血清からアフィニティー精製され、ChIP でテストされた（次の図参照）。

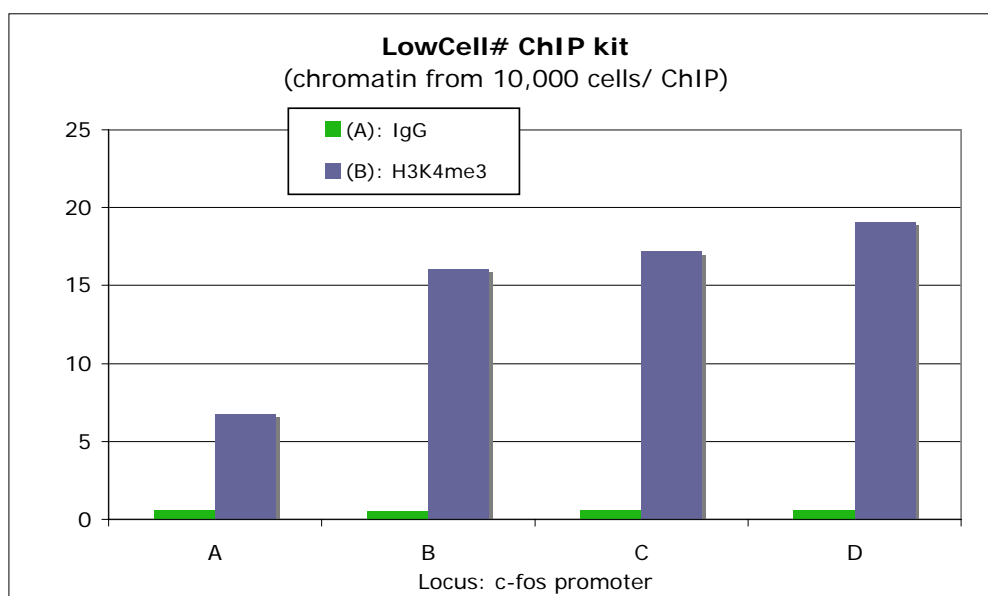
図 10 : Diagenode 社の精製した antibody directed against H3K9me3 で得られた LowCell# ChIP kit の結果



ChIP解析は、LowCell# ChIP Kit、NCCIT細胞、アフィニティー精製した antibody directed against H3K9me3 (Diagenode cat#: pAb-056-050、NIPPON GENE Code No. : 314-80631) と、上記のような同じ至適化された定量PCRプライマーセットを用いて行われた。1 ChIP実験あたり、10,000細胞の断片化クロマチンと1µgの抗H3K9me3抗体が用いられた。IgGはネガティブIPコントロールとして用いられる。Diagenode社の抗H3K9me3抗体を用いて得られた回収率(% of インプット)は、2つの遺伝座:c-fos promotorとSat-2の解析で示される(B)。IgGの回収率の%も示されている(A)。crudeの抗H3K9me3抗体と精製した抗H3K9me3抗体では、両方とも

同じ結果が得られている(図9と図10を比較)。

図 11 : LowCell# ChIP Kit プロトコールを一日で行った



ChIP解析はLowCell# ChIP Kit、ヒト子宮頸癌細胞(HeLa細胞)、アフィニティー精製した antibody directed against H3K4me3 (Diagenode cat#: pAb-003-024、NIPPON GENE Code No. : 317-80501) と Diagenode 社の c-fos promotor 領域を増幅するプライマー (Diagenode cat#: pp-1004-050, -500) を用いて行われた。1 ChIP 実験あたり、10,000細胞の断片化

クロマチンと、1µgの抗H3K4me3抗体が用いられた。Negative IgG(1µg/IP)はネガティブIPコントロールとして用いられる。クロマチンと抗体は、超音波ウォーターバスで30分間インキュベートした(OneDay ChIP kitで行うように)。Paramagnetic beadsとのインキュベーションは次のように行われた: 30分間(A)、1時間(B)、2時間(C)(このマニュアルの“追加プロトコール”セクション参照)。このマニュアルに書かれているようにLowCell# ChIPのプロトコールでも行った(D)。実験B、C、Dの結果は同等である。

5.トラブルシューティングガイドと注意事項

ステップ	トラブル、解決法とコメント	
クロスリンク	クロスリンクが弱すぎる。	固定ステップを、正確な時間、正しい温度、正しいホルムアルデヒド濃度で行ったか確認する。例：終濃度 1%のホルムアルデヒド (w/v) で、8 分間、室温でインキュベートする。また、高純度でフレッシュなホルムアルデヒドを使用する。
	クロスリンクが強すぎる。	
	タンパク質には、DNA に作用するユニークな方法がある。DNA に直接結合はしないが、他の DNA 結合タンパク質と一緒に作用するタンパク質もある。	短かすぎる、又は長すぎるクロスリンク時間は、DNA のロスやバックグラウンドの増大を引き起こす。したがって、経験に基づいて、最高の特異性とChIP効率の出る、至適なクロスリンク時間を見つけるべきである。
	クロスリンク時間とホルムアルデヒド濃度の両方が重要である。	クロスリンクは、クロマチン断片化の効率と、特異的抗原の免疫沈降の効率の両方に影響する。短いクロスリンク時間 (5~10 分間) や、低いホルムアルデヒド濃度 (1%, w/v) は断片化の効率を向上させるかもしれないが、いくつかのタンパク質、特に DNA と直接結合していないものにおいては、これはクロスリンクの効率と免疫沈降されるクロマチンの収量を減少させるかもしれない。
	クロスリンクの至適時間は、細胞のタイプと興味のあるタンパク質で変わる。	10 分間、20 分間、30 分間と、異なるインキュベーション時間をテストすることで、固定化ステップを至適化することができる。30 分間以上のクロスリンクでは、効率のよい断片化ができないので、クロスリンクは 30 分間より長くしない。
	<i>in vivo</i> でのタンパク質とクロマチンの効率のよい固定はChIPの重要なステップである。クロスリンクの程度は最も重要なパラメータであると思われる。	以降の免疫沈降ステップに関して、2つの大きな問題を考慮しなければならない：1/過剰なクロスリンクは、マテリアルのロスやクロマチンの有効な抗原の減少を起こす。2/抗原エピトープのホルムアルデヒドに対する相対的な感受性。したがって、クロスリンクステップを慎重に行うことは重要である。
	ホルムアルデヒドの反応を停止することは必須である。	固定を停止するためにグリシンを使用する。125mM グリシンで 5 分間処理してホルムアルデヒドの反応を止める (513.5 μ l の培地に対して、1.25M グリシンを 57 μ l 添加する。ステップ 2 参照)。又は、固定した細胞を適切に洗浄し、すべてのホルムアルデヒドを除いたことを確認する。
細胞の溶解	細胞が完全に破碎されていない。	溶解バッファーの量に対して、過剰量の細胞を使用しない (w/v)。プロトコルの説明に従う (例：1,000,000 細胞またはそれ以下/130 μ l の完全な Buffer B。ステップ 2 及び 3 参照)。
	温度は重要である。	細胞の溶解は 4 (低温室) 又は氷上で行う。細胞を溶解する間ずっとサンプルは氷上に置き、氷冷したバッファーを使用する。ステップ 3 参照。
	溶解の間にタンパク質の分解が起こる。	使用する直前に、プロテアーゼ阻害剤 (Protease inhibitors) を溶解バッファーに添加する。
細胞のタイプ	キットプロトコールでの確認。	HeLa 細胞、NCCIT、293T 細胞、軟骨細胞、P19 細胞、ASC (脂肪幹細胞)、ケラチン生成細胞は Magnetic ChIP キットのプロトコールで確認した。
1ChIP に必要な細胞の数	ChIP実験に必要な細胞の量は、細胞のタイプ、興味のあるタンパク質、使われる抗体によって決められる。	1 ChIP あたり、1,000~10,000 細胞の使用を推奨する。1 ChIP あたり 100,000 細胞までは使用できたケースもある。スケールに合わせる。プロトコールに示した細胞数と異なる細胞数を用いることもできる。
クロマチンの断片化	至適な断片化条件がChIPの効率のために重要である。	断片化の条件は、各細胞タイプ、固定化プロトコール、超音波破碎装置について至適化する。

	よい断片を得ることが重要である。	特定の細胞タイプと固定化プロトコールのために、断片化条件を最適化する場合。1)少量のサンプル(1×10 ⁶ 細胞またはそれ以下)で始める。2)断片化の効率をチェックすることを薦める。3)サンプルを冷やしておく。4)バッファー組成をチェックする。(断片化バッファーに0.75% SDSが含まれている場合、免疫セレクションの前に、断片化クロマチンを完全な Buffer A で3.5~4倍に希釈する。最終的な SDS の濃度は、0.15~0.20%より高くない方がよい。)
	クロマチンのサンプルを Diagenode社の Bioruptor™で断片化する。	サンプルの温度を0 近くに保つ。サンプルを各サイクル[30秒間 “ON” /30秒間 “OFF”]で10~12サイクル超音波破碎する。トータル時間は10~12分間(この条件は多くの哺乳類細胞系でテストされ、その後のChIP実験も良好であった)。Diagenode社のBioruptor クロマチン断片化のためのトラブルシューティングガイドも利用できる。
	プローブ式ソニケーターのプロトコールを用いたクロマチン断片化。	プローブ式ソニケーター：氷冷して 30 秒間×3 回、各サンプルを超音波処理する。それぞれのパルスの間は氷冷して 30 秒間休止する。泡立たないように気をつける。
クロマチン断片化のバッファー	他のモジュールを使ったクロマチンの断片化。	Red ChIP Kit (Diagenode cat#: kch-redTBP-012、NIPPON GENE Code No. : 310-80471) の断片化モジュールで得られた断片化クロマチンを用いることもできる。 断片化モジュール(Diagenode cat#: kch-redmod-100 または kch-redmod-400)で得られた断片化クロマチンを用いる場合：1,000,000 細胞あたり 30 µl の shearing buffer を添加する。断片化後、必要な量のクロマチン(決定した細胞数に対応して)を新しいチューブに移し、以下のように、総量 130 µl になるように LowCell# ChIP Kit の Buffer B を加える： 1. 断片化したクロマチン 30 µl を 100 µl の Buffer B に添加する(最終的に：1,000,000 細胞/130 µl)。断片化したクロマチン 3 µl を 127 µl の Buffer B に添加する(最終的に：100,000 細胞/130 µl)。
	所属する組織のプロトコールを用いた断片化。	次のように、各自のプロトコールで断片化したクロマチンを用いることもできる(“追加プロトコール”セクション参照)。 所属する組織のプロトコールを用いる場合：用いる shearing buffer の組成をチェックする：0.75%~1% SDS、1~10mM EDTA および/または0~0.5mM EGTA を含み、pH7.6~8.0 であること。断片化したクロマチンは免疫セレクションの前に、Buffer A と Buffer B で希釈する。 1. Buffer B を断片化したクロマチンに添加する(最終的に：1,000,000 細胞/130 µl)。Buffer B を断片化したクロマチンに添加する(最終的に：100,000 細胞/130 µl)。
断片化したクロマチンの解析	断片化の解析をするために、キットのプロトコールに記載したように、断片化したクロマチンから DNA を精製する。	断片化したクロマチンから抽出したトータル DNA を、1%アガロースゲルで泳動する(EtBr で染色する)。断片化したクロマチンをゲル上で解析するために、ステップ 3 で調製した断片化クロマチンから DNA を精製する。断片化していないクロマチンも同様にアガロースゲルで解析できる(インプットサンプルと同様に精製する。“6.追加プロトコール”セクション参照)。100,000 細胞、1,000,000 細胞またはそれ以上の細胞に相当するクロマチンは、ゲル上ではっきりと見える。
	過剰な DNA をゲルにロードしない。	アガロースゲルに DNA を多量にロードすると、真の DNA の断片化を反映しない悪い写真になる。ロードする DNA 量は、ウェルの大きさとゲルの大きさに依存する。
	アガロース濃度	1%~1.5%より濃いアガロースゲルは使わず、ゆっくり泳動する(Volt/cm と時間は、ゲルの大きさに依存する)。
	泳動バッファー濃度	アガロースゲルでスミアになる 0.5×TAE よりは、1×TAE 又は TBE が好ましい。
断片化したクロマチンの量	どれくらいの断片化クロマチンを準備する必要があるか？	ほとんどの断片化クロマチンは ChIP 実験で使用したが、ChIP 実験のインプットサンプル相当分と、アガロースゲルでチェックする分がコントロールとして必要になることを覚えておく。
	免疫セレクションのインキュベーションのために、断片化したクロマチンを ChIP buffer で希釈する。	断片化したクロマチンは、免疫セレクションのインキュベーションの前に、完全な Buffer A で希釈する(ステップ 3 参照：130 µl の断片化クロマチンに 870 µl の完全な Buffer A を添加する)。断片化したクロマチンを少なくとも 7 倍に希釈する。クロマチンに合わせて、添加する ChIP buffer の量を調整する。

抗体結合ビーズ (Antibody binding beads)	ビーズ懸濁液	キットに入っているビーズはProtein Aでコートされている。毎回使用する前に、均一な懸濁液になるようにサスペンドする。
	ビーズの遠心	ビーズを高速で遠心しない。マニュアルのプロトコールに記載したような、穏やかな遠心(500×g、2~3分間)にする。 $g = 11.18 \times r \times (\text{rpm}/1000)^2$; rは回転半径(mm)。1.5mlチューブを使って、1,000~2,000×gで20秒間遠心することもできる。
	ビーズの保存	4℃で保存する。凍結しない。
	抗体の結合能力	ウサギ、モルモット、ブタ、ヒトIgGのポリクローナル抗体。マウス(IgG2)、ヒト(IgG1、2、4)、ラット(IgG2c)のモノクローナル抗体。
プロテアーゼ阻害剤 (Protease inhibitors)	保存	溶液状態で不安定な阻害剤が含まれているので、キットに入っているP.I. mixは-20℃で凍結して保存し、使用前に溶かす。
	完全なバッファー	使用する直前にP.I. mixをバッファーに添加する。PBS(ステップ2及び3)、Buffer B(ステップ3)、Buffer A(ステップ3)。その日の実験で使用する量を調製する。
その他の酵素阻害剤	ホスファターゼ阻害剤のような、特異的な酵素阻害剤はキットには含まれていない。	研究領域やChIP解析する興味のあるタンパク質によって、必要があれば、ホスファターゼ阻害剤やその他の阻害剤をBuffer A及びBに添加する。 ヒストンChIPにはNaBuを添加する。
ChIPのネガティブコントロール	IPインキュベーションミックスで、免疫性のないIgGを使用する。	抗体がつくられたものと同じ種の免疫性のないIgG画分を使用する。
	IPに抗体を添加しない。	抗体でコートしていないビーズとのインキュベーションも、免疫性のないIgGと同様に、ネガティブChIPのコントロールとして使用される。ステップ4で、IPインキュベーションミックスは断片化したクロマチンとビーズを含むが、抗体は含まない。
	特異性をブロックした抗体と、(ブロックしていない)抗体を並行して使用する。	ChIPにおいて、特異的なペプチドでブロッキングした抗体と、ブロッキングしていない抗体を使用する。抗体を特異的にブロックするために: IPインキュベーションミックスで使用する前に、抗体のエピトープを特異的なペプチドで飽和して30分間、室温でプレインキュベートする。ブロックしていない抗体と並行して、ネガティブコントロールとして、ChIPで使用する。
	ネガティブコントロールは何種類必要か?	同じ種の複数の抗体が、同じ時に調製したクロマチンで使われる場合は、すべての抗体に対して1つのネガティブコントロールで十分である。
IPにおける抗体	なぜ自分の抗体はChIPで働いていないのか?	抗体-抗原の認識は、影響を受けやすいエピトープや認識のロスの結果となる、クロスリンクのステップに大いに影響される。
	ChIPにおいては、どの抗体を使えばいいのか?	ChIPグレード抗体を使用する。もし、入手できない場合は、同じタンパク質の異なるエピトープに対する複数の抗体を使用することを推奨する。フレッシュな細胞抽出物で、抗体がIPで直接作用できることを確かめる。また、新しい抗体をテストするときは、ChIP解析のポジティブコントロールとして、ChIPグレード抗体として知られているものを含める。
	ChIP用抗体は、どのようにして選んだらいいのか?	抗体の交差性を確認する。ウエスタンブロット解析で抗体の特異性を確かめる。抗原アフィニティー精製は、ポリクローナル抗体の力価と特異性を高めるために使用される。
	1 ChIPあたり使用する抗体量はどれくらいか?	各ターゲットと抗体について、経験的に決めるべきである。ヒストンのような多く存在するタンパク質については、1 IPあたり、1~2µgのアフィニティー精製抗体、又はモノクローナル抗体を使用する。その他のターゲットについては、1 ChIPあたり最大10µgを使用する。 効率のよいIPを確実にするために、クロマチンの量と抗体の量の至適な比率を知ることが重要である。抗原の特異性が低い場合や、ターゲットタンパク質が多量にある場合(ヒストン等)は、多量の抗体(又は少量のクロマチン)が要求される。過剰な抗体量は特異性の低下に、不十分な抗体量はChIPの効率の低下につながる可能性がある。
	自分の抗体はProtein Aに結合するか?	タイプの異なるイムノグロブリンでは、Protein Aに対するアフィニティーに有意な差がある。例えば、IgMやIgYは、Protein Aと結合する二次抗体を必要とする。

免疫セレクト ションのイン キュベーション	超音波ウォーターバスを使った免疫セレクトションの、最も良いインキュベーション時間はどれくらいか？	断片化したクロマチンと抗体を 15~30 分間インキュベートすることで多くの抗体には作用するが、エピトープと抗体の結合の平衡に達する間のカインेटクスは、各抗体とターゲットによって異なる可能性がある。したがって、条件の最適化は結果を向上させる可能性がある（いくつかの抗体については、インキュベーション時間を長くする必要があるかもしれない。）。
	超音波ウォーターバスを使った免疫セレクトションは、どのような仕組みか？	多くのイムノアッセイの律速となるステップは、高分子抗原と抗体の結合のゆっくりとしたカインेटクスと関係がある。液体/個体インターフェース全体の大量移動を促進する超音波エネルギーの使用が、抗原と抗体の結合を劇的に加速することが示されている。
	超音波ウォーターバスはどこで購入できるのか？	http://www.branson.com/model_3510.asp : Branson cat# CPN-952-316. Fisher Scientific cat#15-337-22F. (日本エマソン株式会社 ブランソン事業本部 : http://www.branson-jp.com/)
	ウォーターバスの仕様は？	型式 MT-3510、タンク容量 : 5.5 liters、洗浄槽寸法 : 29×15×15cm、周波数 : 42kHz、最大要求パワー : 130W、RF-パワー : 130W。
	超音波ウォーターバスがなくてもキットは使えるか？	使用可。その場合は、4 で長時間インキュベートして使用する。抗体と ChIP されるターゲットによって、インキュベーション時間は 2~16 時間の範囲で、各抗体について経験に基づいて決定する。
ポリメラーゼ 連鎖反応 (PCR)	プライマーデザイン	プライマーの鎖長 : 18~24 ヌクレオチド/プライマー T _m 値 : 60 (±3.0) GC 含量 : 50% (±4%)
	コントロール: ネガティブとポジティブ	PCR のネガティブコントロール : 免疫性のない抗体 (negative IgG) で免疫沈降したサンプルの DNA を使った PCR。 または、興味のある抗原が結合していない DNA 領域に特異的なプライマーと ChIP サンプルの DNA を使った PCR。 PCR のポジティブコントロール : インプット DNA を使った PCR。
	PCR のシグナルがない。	PCR ミックス (プライマー、dNTP、マスターミックス) のコントロールとして、インプット DNA や同じ起源の DNA サンプルを使った PCR のポジティブコントロールを含める。
	Ct 値が高い。	インプットクロマチンの量を増やす。
	Ct ^{NegCt1} と Ct ^{Target}	ターゲット IP とネガティブコントロール IP の比は、使用する抗体に依存する。
	バックグラウンドが高い。	次のステップを正しく行ったか確認する : antibody binding beads と DNA purifying slurry を懸濁状態でチューブに加えたか。各チューブに beads と slurry の沈殿が等量入っていることを確認したか。ステップ 5 の洗浄は重要である。
	定量 PCR ではなく、エンドポイント PCR を使用する場合。	アガロースゲル電気泳動を PCR 産物の定量に使用する場合、ターゲット因子の遺伝子座における Relative occupancy は、ターゲットのバンド強度とネガティブコントロール IP のバンド強度の比である。
凍結	プロトコール中のいくつかのステップで、サンプルを凍結できる。	- ホルムアルデヒドで固定した細胞は、- 80 で最低 1 年間は保存できる。 - 免疫沈降される興味のあるタンパク質にもよるが、断片化したクロマチンは - 80 で 1 ヶ月間保存できる。 - ChIP サンプルとインプットサンプルから精製した DNA は、- 20 で数ヶ月保存できる。
	凍結融解の繰り返しを避ける。	瞬間凍結し、氷上で溶かす (例 : 固定化した細胞ペレット、断片化したクロマチン)。

6. 追加プロトコール

解析ステップ：断片化クロマチンの解析

1. 500 μ l 中に 1,000,000 細胞 () または 100,000 細胞 () になるように、130 μ l の断片化クロマチンに、370 μ l の Buffer A を添加する。
2. 等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) を加え、DNA を抽出する。遠心の前に、ローテーターで室温、10 分間、サンプルをインキュベートすることもできる。穏やかに回転させる。
3. 室温で、14,000 \times g (13,000rpm)、2 分間遠心する。上にある水相を新しい 1.5ml チューブに移す。
4. 等量のクロロホルム/イソアミルアルコール (24 : 1) を加える。遠心の前に、ローテーターで室温、10 分間、サンプルをインキュベートすることもできる。穏やかに回転させる。
5. 室温で、14,000 \times g (13,000rpm)、2 分間遠心する。上にある水相を新しい 1.5ml チューブに移す。
6. サンプルに co-precipitant (Diagenode cat# : kch-216-100)、precipitant (Diagenode cat# : kch-217-001) と冷えた 100%エタノールを加えて、DNA を沈殿させる。 - 80 で 30 分間インキュベートする。
7. 4 で、14,000 \times g (13,000rpm)、25 分間遠心する。注意深く上清を除き、沈殿に氷冷した 70% エタノールを 500 μ l 添加する。
8. 4 で、14,000 \times g (13,000rpm)、10 分間遠心する。注意深く上清を除き、残ったエタノールを蒸発させるため、蓋を開けて室温に 30 分間置いておく。
9. 沈殿を 10 μ l または 20 μ l の TE に懸濁する。これが断片化クロマチンから精製した DNA に相当する (チューブの壁についた DNA がないか確認する。時々起こるので、これも溶解する)。
10. 断片化の効率を見るために、サンプル (10 μ l の DNA + 2 μ l の 6 \times loading dye) を 1.5% アガロースゲルで、DNA サイズマーカーと一緒に泳動する。

超音波ウォーターバスを利用してインキュベーション時間を短縮する：

1. 1 IP あたり、希釈した断片化クロマチンを 100 μ l 使用する (ステップ 3、ポイント 24)。各 IP チューブ (0.2ml) に 100 μ l 移す。インプットサンプルとして 100 μ l をキープし、4 に保存する。
 - ❖ 1.100 μ l の断片化クロマチンは 100,000 細胞から得られた。
 - ❖ または .100 μ l の断片化クロマチンは 10,000 細胞から得られた。
 - ❖ または .100 μ l の断片化クロマチンは 1,000 細胞から得られた。
2. 特異的な抗体、コントロール抗体 (ポジティブ及びネガティブ) を添加し、蓋を閉める。メディアムパワーで、5 秒間ボルテックスする。
 - ❖ 使用する抗体に依存するが、1~3 μ g またはそれ以上 (1 反応あたり最大 10 μ g) の抗体を添加する。
 - ❖ トラブルシューティングガイド参照 : Protein A (及び G) の結合能力。
3. 蓋についた溶液を落とすために、抗体の入った 0.2ml チューブを軽くスピンのする。
4. 超音波ウォーターバスで 30 分間インキュベートする。 (4 °C) (“**トラブルシューティングガイド**”)
 - ❖ ウォーターバスの記述は “キットの構成” セクションとトラブルシューティングガイドにある。
 - ❖ インキュベーション時間を最適化する必要があるかもしれない (トラブルシューティングガイド参照)。
5. 蓋についた溶液を落とすために、抗体の入った 0.2ml チューブを軽くスピンし、1 IP チューブあたり 10 μ l の洗浄した Protein A-bead を添加する (ステップ 1、ポイント 2)。
6. 4、1~2 時間、40rpm のローターで IP チューブをインキュベートする。
7. 蓋についた溶液を落とすために、antibody coated beads の入った 0.2ml チューブを軽くスピンする。
8. チューブを氷冷した Magnetic Rack (予め氷上に置いて冷やしておく) に置き、1 分間待つ。
9. 上清を捨てる。antibody coated beads の沈殿を残す。
10. DNA 精製 (ステップ 6) の前に、ステップ 5、ポイント 32、33 (洗浄) に進む。

DNA 検量線

検量線を得るために、既知の DNA 濃度のサンプルの PCR を行う。これは定量 PCR のプレートごとに毎回行わなければならない。処理していない DNA サンプルの 8 種類の希釈系列を作って行う（毎回フレッシュなものを作る）。このキャリブレーションは DNA の相対量を定量するために重要である。このステップにより、装置が実験サンプルとコントロールの希釈を比較し、実験サンプルの濃度が得られる。

- 同じ種または同じ細胞タイプ、可能であれば ChIP に使用した細胞タイプから DNA を調整する。
- ChIP と同じ手法で細胞からクロマチンを調整する。

要約：

- クロスリンク
- 溶解
- 平均鎖長 500bp の断片を得るために、超音波破碎する。アガロースゲル解析で可視化する。
- 細胞残渣を除くために、ハイスピードで遠心する。
- 上清を取り、クロスリンクを外して、Proteinase K 処理を行う。
- 1% SDS、50 μ g/ml Proteinase K を含む溶出バッファー（20 mM Tris-HCl pH7.5、5 mM EDTA、20 mM sodium butyrate、50 mM NaCl）を添加する。
- 1,300rpmに設定したサーモミキサーで、サンプルを 68℃、2 時間インキュベートする。
- トータル 500 μ l になるように、溶出バッファーを添加する。

DNA 精製：

- フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出を 2 回行い、次にクロロホルム/イソアミルアルコール抽出を 1 回行う。
- エタノール沈殿（塩と 100% エタノールを添加）、- 80℃ でインキュベートし、洗浄する。
- 風乾した DNA の沈殿を TE pH8.0（例えば、100 μ l）に懸濁する（容量は細胞数に依存する。溶液に“粘性”がある場合、容量を増やす）。
- 濃度測定の前に全ての DNA を溶解させるために、ボルテックスと遠心を繰り返しながら、室温で約 2 時間溶解し、4℃で一晩置いておく。
- 分光光度計の A260 で DNA 濃度を測定する（A260 が分光光度計で直線の範囲に入る 0.1 から 1 に入るように希釈する）。
- DNA 濃度を計算し、ChIP サンプルの濃度の範囲をカバーする希釈系列を作製する。広範囲に 7 種類の濃度を作る。

例を下に示す。100,000 細胞の NCCIT 細胞からスタートして、50 μ l の TE に溶解し、3.02ng/ μ l（または、15.1ng/5 μ l）の DNA が得られた。DNA サンプルを下記に示したように希釈し、定量 PCR 1 ウェルあたり 5 μ l を使用した：

- スタンダード 1：1/2 希釈 → 7.55ng/5 μ l
- スタンダード 2：1/5 希釈 → 3.02ng/5 μ l
- スタンダード 3：1/10 希釈 → 1.51ng/5 μ l
- スタンダード 4：1/50 希釈 → 0.302ng/5 μ l
- スタンダード 5：1/200 希釈 → 0.0755ng/5 μ l
- スタンダード 6：1/500 希釈 → 0.0302ng/5 μ l
- スタンダード 7：1/1000 希釈 → 0.0151ng/5 μ l
- スタンダード 8：0ng

7. 参考資料

1. Kuo M.H. and Allis C.D. 1999. *Methods* 19 (3):425-33.
2. Orlando V., Strutt H. and Paro R. 1997. *Methods* 11(2):205-14.
3. Chen R., Weng L., Sizto N.C., Osorio B., Hsu C.J., Rodgers R. and Litman D.J. 1984. *Clin. Chem.* 30 (9): 1446-51.
4. Dahl JA, Collas P. 2007 *Stem Cells* 25(4):1037-46.
5. Pfaffl M.W. 2001 *Nucleic Acids Res.* 29(9):e45.
6. Freberg CT, Dahl JA, Timoskainen S, Collas P. 2007 *Mol Biol Cell* 18(5):1543-53.

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 : <http://www.diagenode.com/>

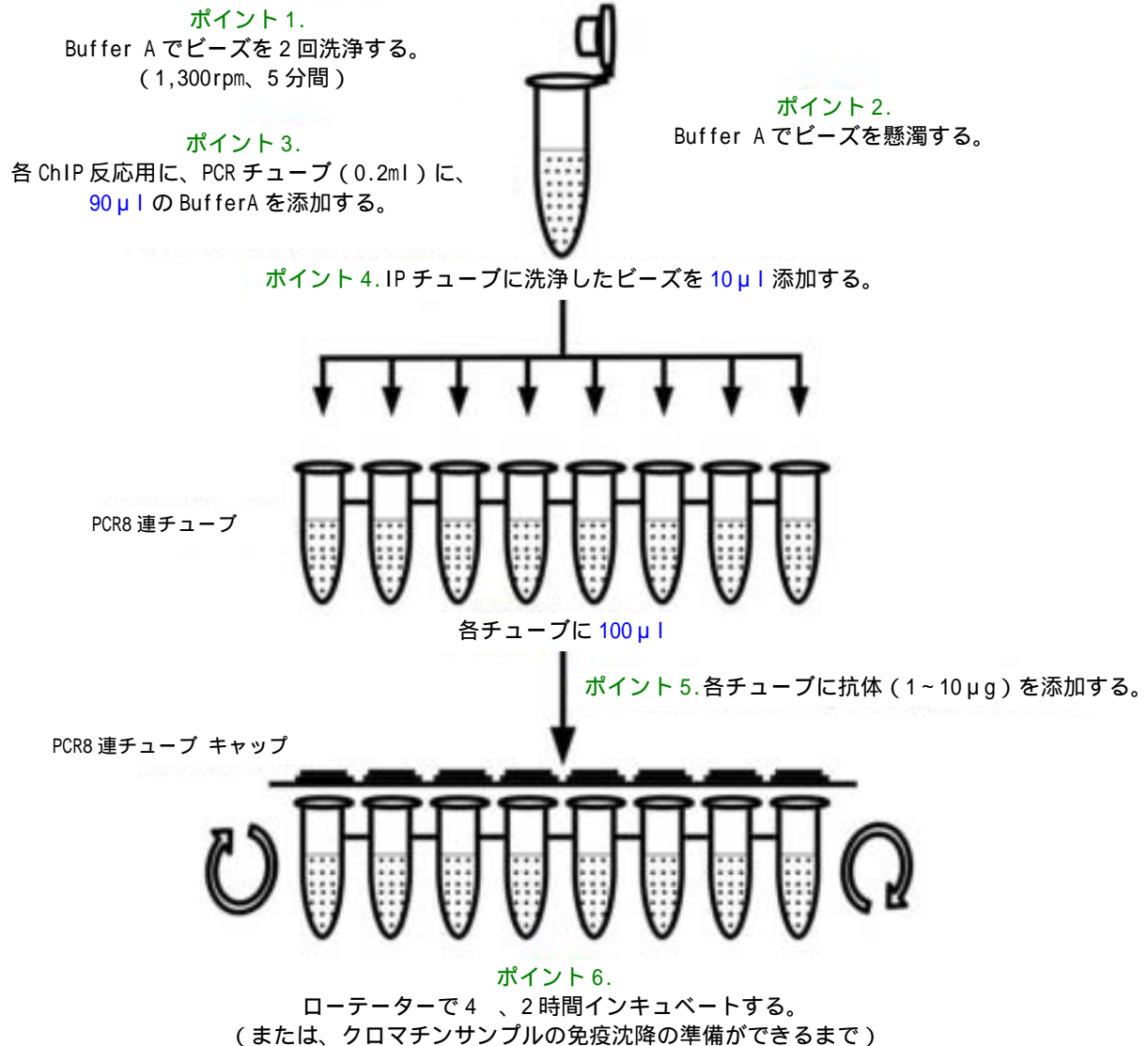
9. 従来のChIPとLowCell# Magnetic ChIPの比較

ChIPのステップ	3日間を要する従来のChIP	DIAGENODE Magnetic ChIP
プロトコルのステップ	ステップが多い。	ステップが少なく、短い。
試薬	多くのバッファーを含む。	1反応あたりに使用するバッファーの種類と試薬の量が少ない。
抗体結合ビーズ	Sepharose beadsをプレブロックする。クロマチンサンプルをプレクリアする。	抗体とMagnetic Beadsを結合させる。
細胞の回収とDNAとタンパク質のクロスリンク	少なくとも 10^7 細胞を回収する。 必要量：1 IPあたり $1\sim 2 \times 10^6$ 細胞	10^6 細胞(または、より少ない)を回収する。 1 IPあたり1,000~10,000細胞で操作する。
細胞の溶解とクロマチンの断片化	Bioruptor以外の超音波装置と自分で調整したバッファーを使った断片化の至適化が面倒で、標準的なプロトコルがない。	Bioruptorと品質管理された試薬を使用する。 130 μ lのBuffer Bに1,000,000細胞 または、130 μ lのBuffer Bに100,000細胞
抗体とクロマチンのインキュベーション	初めに、クロマチンと抗体をインキュベーションする(4時間から一晩)。クロマチンと抗体と一緒にビーズを添加するか、後からビーズを添加し、さらにインキュベーションする(さらに1~3時間)。	Magnetic 免疫沈降 10,000または1,000細胞のクロマチン(1 IPあたり)に870 μ lのBuffer Aとantibody coated-beadsを添加する。 インキュベーション(クロマチンとantibodies coated-beads)は2~16時間またはそれより短い(タイムテーブル参照)。
免疫複合体の洗浄	バッファーを加え、混合、インキュベーション、遠心による洗浄。3~4種類のバッファーを用いて全部で6~8回の洗浄を行う。	1種類のバッファーで3回洗浄する。
DNA精製	四つの長いステップ： 1/ ビーズからクロマチンを溶出する(30分間)。 2/ クロスリンクをはずす(65 で4時間)。 3/ proteinase K処理(37 ~42 で1~2時間) 4/ フェノール/クロロホルム抽出またはカラム(1時間から一晩)	一つの短いステップ: DNA slurry (10分間)
PCR	エンドポイントPCR	定量PCR、ChIP-chip、ChIP-seq
データ解析	定量性がない。	定量的(生データと式がマニュアルにある)

10. LowCell# ChIP kit : クイックチャート

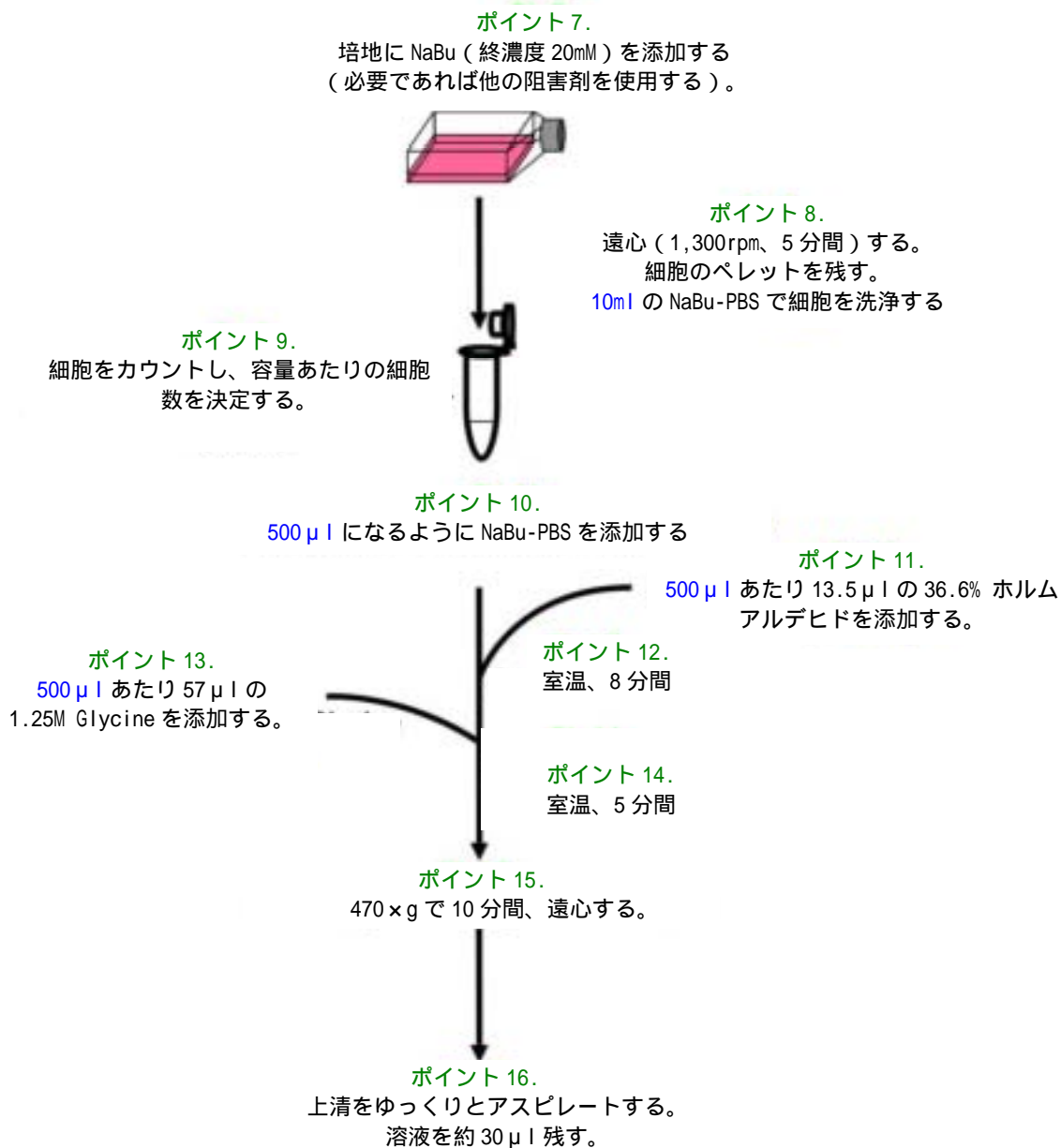
ビーズを興味のある抗体とインキュベートする（ステップ 1）。その間に、細胞を回収し（ステップ 2）、クロマチンを断片化する（ステップ 3）。クロマチン断片化の効率を確認する（解析ステップ参照）。次に、IP が行われる：断片化クロマチンを antibody-coated beads とインキュベートする（ステップ 4）。IP の次に、ビーズを洗浄する（ステップ 5）。免疫沈降された DNA を精製し（ステップ 6）、定量 PCR で解析する（ステップ 7）。

ステップ 1. 抗体-ビーズ複合体の調整



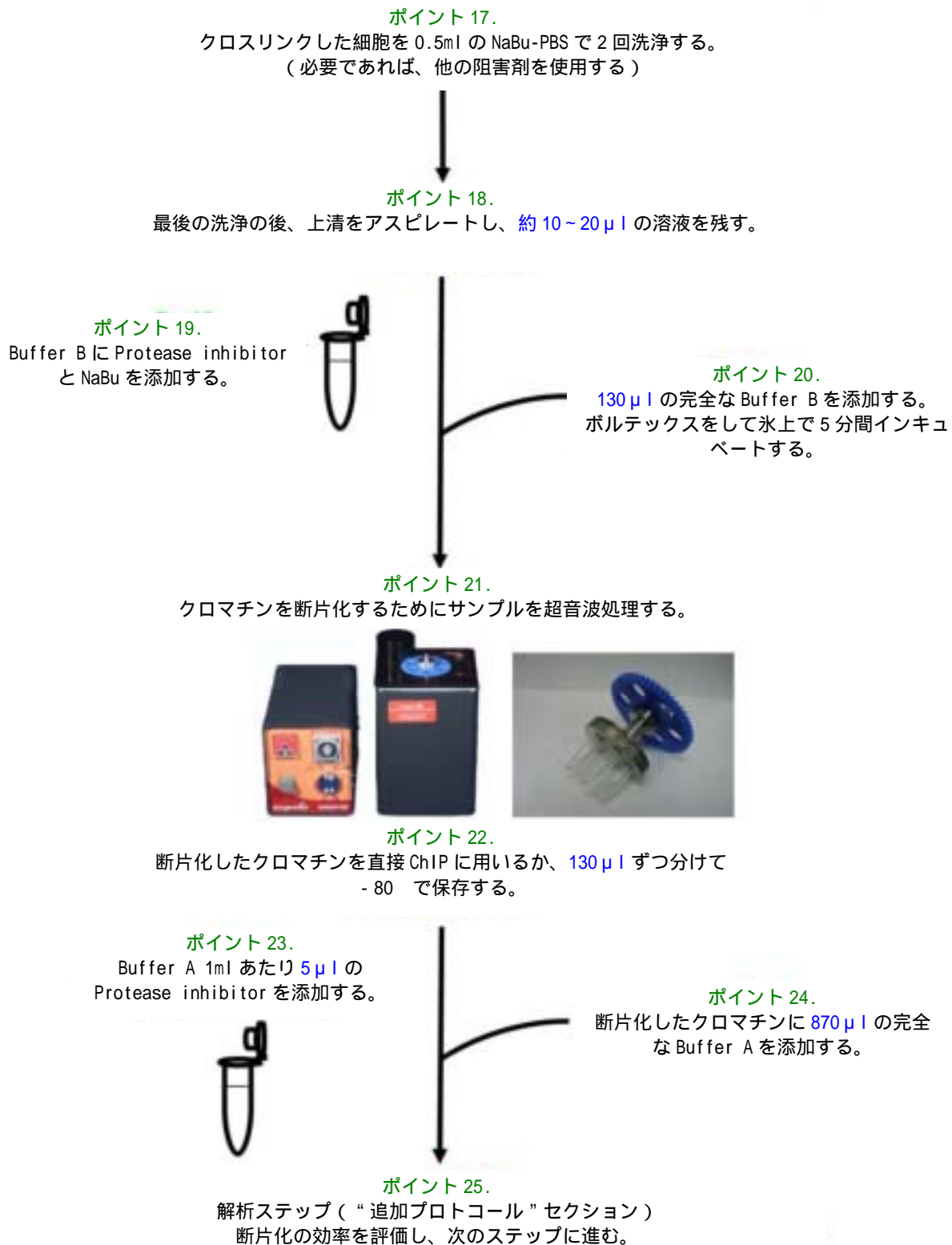
ステップ 1 を上に示す。まず、ビーズを個々の IP チューブに加える前に洗浄し、選択した抗体とインキュベートする。ネガティブ IP チューブ、ポジティブ IP チューブ、隣に興味のある IP チューブを含む。ChIP で確認された抗体の使用を強く推奨する。!! : 新しい抗体を使用する場合、ChIP に使用する最適な量を決定するために抗体を滴定 (例 : 1~10 μ g) する (トラブルシューティングガイドと結果のセクション参照)。

ステップ 2. 細胞の回収と DNA-タンパク質のクロスリンク



ステップ 2 は、断片化クロマチンの調整 (ステップ 3) と、その後のクロマチン免疫沈降実験 (ステップ 4) に使うための細胞の回収と固定からなる。!! : 他の指示がない限り sodium butyrate (終濃度 20mM) を全ての溶液に添加することに注意する。必要であれば他の阻害剤を使用する。

ステップ 3.細胞の溶解と Bioruptor でのクロマチンの断片化

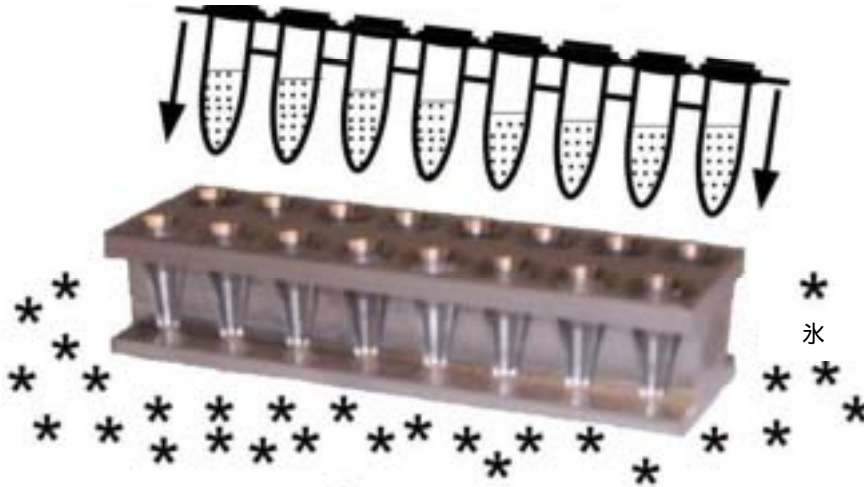


ステップ 3 を上に示す。このセクションは、細胞の溶解と Bioruptor でのクロマチンの断片化について述べている。この段階では、ChIP とそれに続く免疫沈降した DNA の PCR 解析に適したサイズの断片を作ることが重要である (200 ~ 1000bp)。!! : Buffer B は使用前に室温に置いておく。!! : 他の指示がない限り、この後の全てのステップは氷上で操作する。

ステップ 4 及び 5. Magnetic 免疫沈降と洗浄

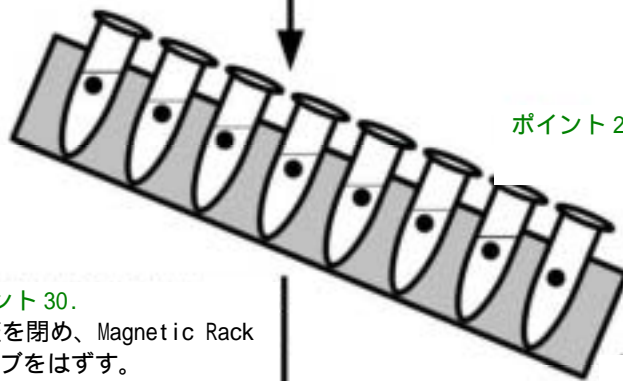
ポイント 26. antibody-coated beads が入った PCR チューブを軽くスピンのする。

ポイント 27. チューブを氷冷した Magnetic Rack に置く。



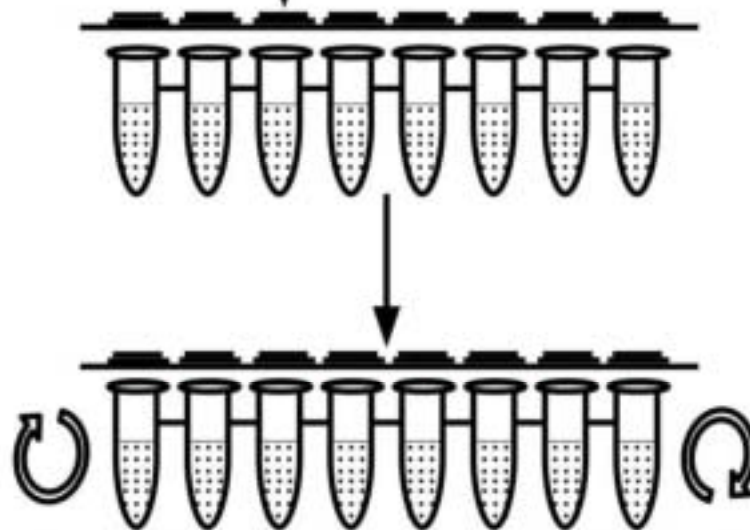
1 分間待つ。

ポイント 28. 上清を捨てる。



ポイント 30.
PCR 8 連チューブの蓋を閉め、Magnetic Rack
からチューブをはずす。

ポイント 29.
希釈した断片化クロマチンを
100 μ l 添加する。



ポイント 31.4 で 2 時間から一晩、ローテーターでインキュベートする。

ステップ 4 及び 5 : IP と洗浄ステップでのビーズの操作は上に示したように簡単である。
LowCell# ChIP kit: *The Low Cell Number Magnetic Chromatin IP*
Diagenode manual