

Magnetic メチル化 DNA 免疫沈降キット

MagMeDIP Kit™

NIPPON GENE Code No. 311-81001

(Diagenode Catalog # : mc-magme-A10)

Instruction Manual (version 01)

(日本語訳 第1版)

このマニュアルは、Diagenode 社の MagMeDIP Kit™ (48 回用) に添付されている Instruction Manual (Version 1.05.09) を、ニッポンジーンで翻訳したものです。

最新の情報は、Diagenode 社の英語版マニュアルをご確認ください。

なお、キットのモジュールと内容 (6 ページ) は 10 回用の容量に変更されています。

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ください。

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

目次

はじめに	3
キットの構成	5
キット内容	5
本品以外に必要な試薬・消耗品・装置	5
キットのモジュールと内容	6
タイムテーブル	7
プロトコール	
ショートプロトコール	8
詳細なプロトコール	12
ステップ 1：細胞の回収と溶解	14
ステップ 2：核酸抽出と DNA 精製	15
ステップ 3：DNA 断片化	17
ステップ 4：メチル化 DNA 免疫沈降	19
ステップ 5：洗浄	22
ステップ 6：DNA 単離	23
ステップ 7：免疫沈降した DNA の定量 PCR 解析	26
MagMeDIP Kit 結果	29
追加プロトコール	29
トラブルシューティングガイド	30
参考資料	31
お問い合わせ	31

はじめに

Diagenode 社の新しい MagMeDIP kit は最初の MeDIP kit 同様、メチル化 DNA 免疫沈降のために設計されています。しかしながら、この二番目のバージョンは、マグネットでさらに至適化され、下記や次の表に示すように、いくつかの利点があります。

MeDIP kit や MagMeDIP kit のような Diagenode 社のメチル化 DNA 免疫沈降キットには、Diagenode 社の抗 5 メチルシジチン抗体が meDNA と unDNA IP コントロールと同様、提供されています。免疫沈降は、私たちの抗体、バッファー、プロトコールにより、特にメチル化 DNA を選んで沈殿させるために最適化されました。免疫沈降の効率は、私たちの内部コントロールを使用することで、再確認できます。

MeDIP kit は、サンプルのメチル化解析を、至適化された内部 IP コントロールと一緒に、全て 1 チューブで行うことができます。

このメチル化 DNA 免疫沈降の方法は、あなたの DNA サンプルと一緒に使用するためのメチル化 DNA (meDNA) と非メチル化 DNA (unDNA) コントロールを提供することで、免疫沈降したものとメチル化状態の直接相関を可能にしています。

このメチル化解析は、速くて、特異性が高く、各 IP は品質が管理されます：これは信頼性のある結果の重要な鍵となります。

MagMeDIP kit のプロトコールは、研究者がこれまで行ってきた伝統的な方法よりも小さなチューブで行えるように改良されました。このキットは一反応あたり少量の試薬（抗体だけでなくバッファーも）で行えます。このキットはまた、他のキットに比べてバッファーの種類が少ないため、より安価で簡単に操作できるようになっています。私たちの Magnetic メチル化 DNA 免疫沈降の方法は、ステップ数が少なく、操作がより簡単になっています。変更点と改良点は下の表に記載してあります。さらに、プロトコールの柔軟性も増しており、下流のアプリケーションに基づいて、異なる方法で免疫沈降した DNA を単離、精製できます：特に、速くて簡単なプロトコールが MagMeDIP kit に含まれています（定量 PCR 解析用）；さらに伝統的な方法も提供されています（オプション#2 と追加モジュール参照）。そのうえ、MagMeDIP kit 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。Diagenode 社の 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。

Magnetic システムと最適化のおかげで、私たちの Magnetic Rack を使用する MagMeDIP Kit のプロトコールは、必要な試薬の量も種類も少なく、ユーザーフレンドリーです。

キットのプロトコールは、DNA 単離/精製の段階で、単離された DNA があらゆる種類の技術によって解析できるように、より柔軟になっています。さらに、いくつかのモジュールが、上流及び下流の実験のために入手できます。

MeDIP kit のプロトコールにおいて、DNA の断片化は Bioruptor で検証されていますが、使用前に効率をチェックさえすれば、各自のプロトコールや超音波装置の使用も可能です。

MagMeDIP kit はメチル化 DNA 免疫沈降解析に必要な試薬が全て含まれていますが、2つの追加のモジュールを購入できます：1/ 大量のゲノム DNA の調製、2/ 次世代シーケンス解析のための免疫沈降した DNA の“伝統的な”精製。

1/ XL GenDNA モジュールは、メチル化 DNA 免疫沈降用の DNA を大量に調製するために最適化されています。その上、DNA 断片化のための最適化されたプロトコールが提供されています。

2/ DNA 精製モジュールは、IP 後の洗浄したビーズからの DNA の溶出（Buffer D、E、F を使用）と続いて行うフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿（DNA-IP TE、DNA-IP co-precipitant、DNA-IP precipitant を使用）に必要な試薬とバッファーが全て含まれています。溶出後に精製カラムを使用することもできます。

ステップと試薬	MeDIP Kit	MagMeDIP Kit
IP チューブ	1.5 ml チューブ	200 μ l チューブ
1 IP あたりの DNA 量	1 μ g	-
変性前の DNA ミックス		
DNA 添加前の容量	65 μ l（水、Buffer A、B、コントロール） （最小 28.50 μ l）	-
DNA 量	10 μ l（または、最大 47.5 μ l）	-
スタート時のトータル反応量	75 μ l	-
DNA 変性	95 3 分間	-
抗体の添加	抗体とバッファー（A、C、水）を添加 : 5 μ l	-
この段階でのトータル反応量	80 μ l	-
ビーズ添加		
ビーズのタイプ	磁性ビーズではない。	磁性ビーズ（10 μ l）
IP 反応に添加するビーズの量	20 μ l	洗浄したビーズを 1 IP あたり 20 μ l
トータル反応量	100 μ l	-
インキュベーション	DNA + Buffer A、B、C + コントロール + 抗体 + ビーズ	-
	4 で 5 時間または一晩	-
IP notes		
IP バッファー	5 x	-
IP 反応量	100 μ l	-
抗体量	0.30 μ l	0.15 ~ 0.30 μ l
IP の洗浄		
洗浄の回数	6 回	4 回
一回の洗浄に使用する量	100 μ l	-
使用するバッファーの種類	4 種類	2 種類
		“- ” は MeDIP kit と同じ

キットの構成

キット内容

キットには 10 回分のメチル化 DNA 免疫沈降 (Methyl DNA IP) を行うのに十分な試薬が入っています。キット内容の詳細については、表 1 を参照してください。

製品到着後、試薬はそれぞれ表 1 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

免疫沈降と定量 PCR 解析に必要な試薬・消耗品

- ・ラボ用手袋 (全ての操作で着用)
- ・オートクレーブ滅菌済みのピペットチップ
- ・RNase/DNase-free の 1.5-ml (または 2-ml) チューブ
- ・PCR チューブと試薬
- ・水

免疫沈降と定量 PCR 解析に必要な装置

- ・Magnetic Rack (Diagenode cat.#: kch-816-001、NIPPON GENE Code No. : 314-80751)
- ・微量遠心機 (4)
- ・ローテーター (4)
- ・ボルテックスミキサー
- ・サーモミキサー (55 、 95)
- ・定量 PCR 装置

DNA 調製と断片化に必要な試薬・消耗品・装置

- ・1.5-ml チューブ、50 ml チューブ
- ・トリプシン-EDTA
- ・氷冷した PBS バッファー
- ・アガロース及び TAE バッファー
- ・DNA 分子量マーカー
- ・遠心機 (1.5 ml 及び 50 ml チューブ用 (4))
- ・アガロースゲル電気泳動装置
- ・セルカウンター
- ・密閉式超音波破碎装置 Bioruptor™ (Diagenode cat.# : UCD-200) *

免疫沈降した DNA 精製に必要な試薬 (オプション #2)

- ・Diagenode 社の DNA purification module (Diagenode cat.# : mc-magme-002) **
- ・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)
- ・100% エタノール
- ・70% エタノール
- ・ドラフト

*: 日本国内において、密閉式超音波破碎装置 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™ (cat.# : UCD-200) は日本では販売していません。

** : 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。

キットのモジュールと内容

表 1 (注意：製品到着後、各試薬は下記に示す正しい温度で保存してください。)

GenDNA モジュール			
内容	コメント	容量	保存
GenDNA Digestion buffer	界面活性剤、塩、イオンキレート剤が含まれます。	3 ml	4
GenDNA Proteinase K (200×)	200×のストック溶液です。	300 µg/15 µl	- 20
GenDNA precipitant	塩が含まれます。	3 ml	4
GenDNA TE	イオンキレート剤が含まれます。	3 ml	4
GenDNA RNase (DNase free)	-	5 µg/10 µl	- 20

メチル化 DNA IP モジュール (10 IP 分)			
内容	コメント	容量	保存
Magbeads	ビーズは最低 10 IP 分含まれます。 阻害剤と 0.02% アジ化物が含まれます。	150 µl	4 凍結厳禁
Water	-	2 ml	4
MagBuffer A	界面活性剤ミックス、塩、イオンキレート剤が含まれます。	2 ml	4
MagBuffer B	-	100 µl	4
MagBuffer C	-	40 µl	- 20
Antibody anti-5meC	-	5 µl	- 20 (- 80)
meDNA Positive control	メチル化 DNA コントロール	20 µl	- 20
unDNA Negative control	非メチル化 DNA コントロール	20 µl	- 20
MagWash buffer-1	界面活性剤ミックス、塩、イオンキレート剤ミックスが含まれます。	6 ml	4
MagWash buffer-2	イオンキレート剤が含まれます。	4 ml	4
DNA isolation Buffer (DIB)	-	4 ml	4
Proteinase K	100×のストック溶液です。	40 µl	- 20
Primer pair #1 (meDNA control)	各 10 µM (フォワード & リバース)	50 µl	- 20
Primer pair #2 (unDNA control)	各 10 µM (フォワード & リバース)	50 µl	- 20
hum meDNA primer pair (TSH2B)	各 10 µM (フォワード & リバース)	50 µl	- 20
hum unDNA primer pair (GAPDH)	各 10 µM (フォワード & リバース)	50 µl	- 20
200 µl tube strips	-	2	室温
Cap strips	-	2	室温

GenDNA モジュールは MagMeDIP Kit (Diagenode cat.# : mc-magme-A10、NIPPON GENE Code No.311-81001) に含まれており、免疫沈降 10 回分に必要な十分量のゲノム DNA を調製できます。違う細胞からゲノム DNA を調製する場合は、別途 XL GenDNA モジュールの購入が必要になることもあります。

MagMeDIP Kit には、免疫沈降後の DNA 単離のために最適化した DNA 単離バッファー (DIB) が含まれています。また、フェノール/クロロホルム/イソamilアルコールやカラムを使った精製を選択する場合には、追加モジュールの DNA 精製モジュールを用いることもできます。ステップ 6 DNA 単離参照。

追加モジュールの詳細については、Diagenode 社 website (<http://www.diagenode.com/>) 及び英語版マニュアル 9 ページを参照してください。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。

タイムテーブル

初めに、DNA を調製する。

表 2a

GenDNA モジュール			
	モジュール	日程	所要時間
ステップ 1	細胞の回収と溶解 - 出発材料：培養細胞 - 細胞の溶解	1 日目	40 分間 + 一晩
ステップ 2	核酸抽出と DNA 精製 DNA 解析	2 日目	数時間
ステップ 3	DNA 断片化	2 日目	20 分間

次に Magnetic メチル化 DNA 免疫沈降を行う。

表 2b

メチル化 DNA IP モジュール			
	モジュール	日程	所要時間
ステップ 4	メチル化 DNA 免疫沈降	2 日目	5.5 時間
ステップ 5	洗浄	2 日目	30 分間
ステップ 6	DNA 単離	2 日目	30 分間* (または 5 時間**)

または

ステップ 4	メチル化 DNA 免疫沈降	2 日目	1.5 時間 + 一晩
ステップ 5	洗浄	3 日目	30 分間
ステップ 6	DNA 単離	3 日目	30 分間** (または 5 時間***)

最後に、免疫沈降した DNA の解析を行う。

表 2c

メチル化 DNA IP モジュール			
	モジュール	日程	所要時間
ステップ 7	定量 PCR	2 日目*、3 日目**、 または 4 日目***	3 時間

- DNA 調製は 1 日（上記 1 日目）で終了し、次の日（2 日目）のために準備される。
- 免疫沈降（ステップ 1）は 5 時間または一晩のどちらでも行える。
- ステップ 2 で DNA を精製する方法によって、定量 PCR は早ければ 2 日目*、遅くても 3 日目**、または 4 日目***に実施される（*、**、***は DNA 精製の方法と定量 PCR の日程のリンクを示している）。

プロトコール

ショートプロトコール

ステップ 1. 細胞の回収と溶解

1. 血清を含む培地から細胞を集める。接着細胞はトリプシン処理してフラスコから細胞を回収する。
4 で 300 × g、5 分間遠心する。
2. 上清を捨てる。5 ~ 10 ml の氷冷した PBS で細胞を懸濁する。500 × g で 5 分間遠心する。上清を捨てる。この懸濁と遠心のステップをもう一度繰り返す。
3. 1 ml の GenDNA Digestion buffer に 5 μl の GenDNA proteinase K を添加し、完全な Digestion buffer を調製する。
4. 完全な Digestion buffer で細胞を懸濁する (1.5×10^6 細胞 / 500 μl)。
5. 細胞の溶解：しっかりとチューブの蓋をしめ、50 で 12 時間から 18 時間振とうしながらインキュベートする。

ステップ 2. 核酸抽出と DNA 精製

1. 等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールでサンプルを入念に抽出する。
2. スイングローターで、1,700 × g 10 分間遠心する。
3. 水相 (上層) を新しいチューブに移す。
4. 1/2 量の GenDNA precipitant と 2 倍量の 100% エタノールを添加する。
5. 1,700 × g で 5 分間遠心して DNA を回収する。
6. 沈殿を 70% エタノールでリンスする。エタノールを捨て、沈殿を風乾する。
7. DNA の沈殿を ~ 1 mg/ml となるように GenDNA TE で懸濁して溶解する。溶解を促進するために、室温または 65 で数時間、穏やかに振とうする。4 で保存する。
8. 必要であれば、この段階で DNA サンプル 1 ml あたり 2 μl の GenDNA RNase (DNase-free) を添加し、37 で 1 時間インキュベートして、残存 RNA を取り除くことができる。続けてフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行う (上記のポイントと同様に) 。
9. DNA 調製の効率を可視化するために、DNA サイズマーカーと一緒にサンプルを 1% アガロースゲルで泳動する。

ステップ 3. DNA 断片化

1. 1.5 ml チューブに、0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるように DNA サンプルを GenDNA TE で希釈する。
2. 1.5 ml チューブに、最終容量 300 μl の DNA サンプル (3 μg) を入れて使用する。
3. Bioruptor を使って DNA を断片化する：“LOW” パワーで次のサイクルを行う：[15 秒間 “ON”，15 秒間 “OFF”] でトータル 10 分間。
4. 断片化した DNA をアガロースゲルで解析する。

ステップ 4. 及びステップ 5. メチル化 DNA 免疫沈降と洗浄

1. 次のように IP インキュベーションミックス (1 サンプル+1 インプット) を準備する：1 IP あたり 90 μl :45 μl の水、24 μl の MagBuffer A、6 μl の MagBuffer B、1.5 μl の meDNA Positive control、1.5 μl の unDNA Negative control、12 μl の断片化した DNA (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) を含む。
2. 200 μl の“IP”チューブ (8 連チューブ) に、1 IP あたり 75 μl の IP インキュベーションミックスを添加する。
インプット用に新しい 1.5 ml チューブにラベルし、7.5 μl の IP インキュベーションミックスを添加する。
3. 95 °C で 3 分間インキュベートする。
4. 氷上で急冷する (氷水の使用がベストである)。
5. すぐに、4 °C で軽く遠心する。
6. 処理した DNA は 4 °C に置く。インプットサンプルは、ステップ 6 の DNA 単離まで置いておく。

ビーズの調製

7. MagBuffer A を 1 : 5 に希釈して、ビーズ洗浄バッファを準備する (1 IP あたり 100 μl)。
8. キットに入っている Magbeads を懸濁し、必要量の Magbeads を新しいチューブに移す (1 IP あたり 11 μl のビーズ)。
9. チューブを磁石に置くか、遠心して上清を除く。ビーズをキープする。
10. 氷冷したビーズ洗浄バッファで次のように Magbeads を 2 回洗浄する：1 IP あたり 22 μl のバッファを加えてビーズを懸濁し、1,300 rpm で 5 分間遠心し (容量が小さい場合は、代わりに Magnetic Rack を使用する) 上清を捨てビーズの沈殿をキープする。
11. 洗浄後、ビーズを 1 IP あたり 22 μl のビーズ洗浄バッファで懸濁し、氷上に置く。

IP の続き

- 新しいチューブに、キットに入っている**抗体**を水で 1 : 2 に希釈する。2 μ l で 6 IP まで行うことができる。
- 1:2 に希釈したフレッシュな抗体を使って、下記の表に示したような**希釈抗体ミックス**を調製する。最初に抗体、MagBuffer A、水を加える。その後、MagBuffer C を添加する。

表：希釈抗体ミックスを調製するための IP 数ごとの試薬容量

試薬	1 IP 分	2 IP 分	4 IP 分	6 IP 分	8 IP 分
抗体 1 : 2	0.30 μ l	0.75 μ l	1.50 μ l	2.00 μ l	3.00 μ l
MagBuffer A	0.60 μ l	1.50 μ l	3.00 μ l	4.00 μ l	6.00 μ l
水	2.10 μ l	5.25 μ l	10.50 μ l	14.00 μ l	21.00 μ l
MagBuffer C	2.00 μ l	5.00 μ l	10.00 μ l	13.00 μ l	20.00 μ l
最終容量	5.00 μ l	12.50 μ l	25.00 μ l	33.00 μ l	50.00 μ l

- IP チューブ (200 μ l) に 5 μ l の**希釈抗体ミックス**を添加する。
- 各 IP チューブ (200 μ l) に、20 μ l の洗浄したビーズを加え、混合する。
- 4 で 4 時間または一晩、ローテーターに置いておく。

IP 後の洗浄

- MagWash buffer と Magnetic Rack を氷上に置く。
- IP チューブを氷冷した Magnetic Rack に置き、氷上で 1 分間待ち、バッファーを捨てる。
- 100 μ l の氷冷した MagWash Buffer-1 で、DNA IP サンプルを 3 回洗浄する。
- 100 μ l の氷冷した MagWash Buffer-2 で、再びビーズを洗浄する。
- 最後の洗浄の後 (P200 のピペットを使って) 残った洗浄バッファーを捨てる。ビーズの沈殿は氷上に置き、次のステップに進む。

ステップ 6. DNA 単離

- インプットサンプルを軽く遠心する。ここから先はインプット DNA サンプルと IP サンプルを並行して処理する。
- 以下のように、**完全なバッファー-DIB**を調製する。DNA isolation Buffer (DIB) 100 μ l あたり、1 μ l の Proteinase K を添加する。IP した DNA サンプルには 100 μ l、インプット DNA サンプルには 92.5 μ l 必要なことを考えて、スケールは調節する。
- Magnetic Rack からチューブを取り出し、IP した DNA サンプルに 100 μ l の**完全な DIB**を添加する。ビーズを懸濁し、1.5 ml チューブに懸濁液を移す。

4. 7.5 μ l のインプット DNA サンプルに 92.5 μ l の**完全な DIB** を添加する。
5. IP した DNA サンプルとインプット DNA サンプルを 55 で 15 分間インキュベートする。
6. 全てのサンプルを 100 で 15 分間インキュベートする。
7. 4 で、14,000 rpm 5 分間遠心する。
8. 上清を新しいチューブに移す。これが、定量 PCR 用の DNA である。-20 で保存する。他の精製方法(フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出またはカラム)は 24~25 ページ参照。

ステップ 7. 免疫沈降した DNA の定量 PCR 解析

1. 精製した DNA を希釈し、分注する。メチル化 DNA IP と DNA インプットから精製した DNA を使用する。単離した DNA 100 μ l のうち、5 μ l を PCR に使用する。
2. SYBR Green PCR マスターミックスを使って、定量 PCR ミックスを調製する。定量 PCR ミックス(トータル反応容量は 25 μ l : 1.00 μ l のキットに入っている**プライマーペア**(ストック : 各 10 μ M : リバースとフォワード) 12.50 μ l のマスターミックス(例 : iQ SYBR Green supermix) 5.00 μ l の希釈した精製 DNA サンプル(DNA の希釈は上記参照) 6.5 μ l の水。
3. PCR サイクル : 増幅 : 95 7 分間、(95 15 秒間、60 1 分間) \times 40 サイクル、95 1 分間

詳細なプロトコール

出発材料 – 培養細胞または組織

各メチル化 DNA 免疫沈降解析には $1\ \mu\text{g}$ の DNA が必要である ; スケールは調整する。

- GenDNA モジュールは、 $1\sim 3\times 10^6$ 細胞から数回分のゲノム DNA のバッチを調製するのに十分な、大過剰量のバッファーを提供している。(GenDNA のステップ 1 参照、出発材料に合わせてスケールを調整する)。プロトコールは組織からの DNA 抽出にも対応している (GenDNA ステップ 1 参照)。
- 約 3×10^6 細胞から、 $20\sim 30\ \mu\text{g}$ の DNA が得られると思われる (下記表 3 及び GenDNA ステップ 1、ポイント 4、ポイント 12 参照)。
- 1 IP あたり $1\ \mu\text{g}$ の DNA が必要なことを忘れなければ、より少ない細胞で始めることも可能である (表 3)。
- 使用する出発材料に合わせて容量を調整する。実行できる IP の数は使用する調製済 DNA の量に依存する (表 3)。
- インダクションや処理した細胞についても、未処理の細胞と同様に調製し、メチル化 DNA 免疫沈降の研究に用いることができる。正常な細胞 (健康な人) とガン細胞 (患者) の DNA サンプルを並行して進め、比較することもできる。
- 可逆的にクロスリンクされた断片化クロマチンから DNA サンプルを精製し、メチル化 DNA 免疫沈降で使用することも可能である (GenDNA ステップ 1)。
- DNA 調製の後、ほとんどの DNA は免疫沈降実験に使用するために断片化されるが、調製した DNA と断片化 DNA の一部はコントロールとして必要である :
 - 1/ DNA 調製の効率チェック用 (メチル化 DNA 免疫沈降の前 : ステップ 2 ポイント 14 : DNA 解析)
 - 2/ 断片化の効率チェック用 (メチル化 DNA 免疫沈降の前 : ステップ 3 ポイント 18 : 解析)
 - 3/ IP 実験の効率チェック用 : インプットサンプル (ステップ 6- DNA 単離)

表 3

DNA 調製	必要な細胞数	DNA 量 (推定)	IP に用いる DNA
メチル化 DNA 免疫沈降 1 回分	0.3×10^6	$2.0\sim 3.0\ \mu\text{g}$	$1\ \mu\text{g}$
メチル化 DNA 免疫沈降 10 回分	$1\sim 1.5\times 10^6$	$8\sim 12\ \mu\text{g}$	$10\ \mu\text{g} / 10\ \text{IPs}$
	3×10^6	$20\sim 30\ \mu\text{g}$	$20\ \mu\text{g} / 20\ \text{IPs}$

メチル化 DNA 免疫沈降のための DNA 調製

この最初のステップの目的は、高分子量のゲノム DNA を得ることである。

Diagenode 社の GenDNA モジュールは、メチル化 DNA 免疫沈降で使用するためのゲノム DNA を、培養細胞や哺乳類組織から調製するために至適化されている。

注意：

- 高分子量のゲノム DNA を “ 各自の ” プロトコールと試薬で調製することも可能であるが、IP で使用する DNA の純度はとても重要なので、GenDNA モジュールを使用することを強く推奨する。
- あなた自身のプロトコールと試薬で調製した DNA サンプルを既に持っているのであれば、その DNA がフェノール・クロロホルム及びクロロホルム抽出後、共沈剤を添加しないエタノール沈殿を行って精製されたものであることが重要であることに注意する。
- 可逆的にクロスリンクされた断片化クロマチンから DNA サンプルを調製し、メチル化 DNA 免疫沈降で使用することも可能である。この可逆化は 65 °C、4 時間で実施される。そして、脱クロスリンクしたクロマチンから、フェノール・クロロホルム及びクロロホルム抽出後、エタノール沈殿を行って DNA を精製し、最終的に TE に溶解する（詳細については Red ChIP Kit のマニュアル参照）。

ステップ 1. 細胞の回収と溶解

出発材料：細胞溶解前の培養細胞

1. 血清を含む培地から細胞を集める。接着細胞は、トリプシン処理してフラスコから細胞を回収する。
4 で 300 × g、5 分間遠心する。
 - ・ 300 × g 程度（約 1,800 rpm：使用する遠心機による）の低速を使用することを推奨する。× g と rpm の変換式についてはトラブルシューティングガイドを参照。
 - ・ 細胞を取り扱うときは、500 × g（2,300 rpm）よりも高速での使用を避け、穏やかに遠心する。
2. 上清を捨てる。5～10 ml の氷冷した PBS で細胞を懸濁する。500 × g で 5 分間遠心する。上清を捨てる。この懸濁と遠心のステップをもう一度繰り返す。このステップは細胞を洗浄するために行う。
 - ・ この間に、GenDNA Digestion buffer を室温に、GenDNA proteinase K を氷上に置いておく（下記ポイント 3 で使用するため）。
3. 1 ml の GenDNA Digestion buffer に 5 μl の GenDNA proteinase K を添加して、完全な Digestion Buffer を調製する。
4. 完全な Digestion buffer で細胞を懸濁する（1 倍量）。
 - ・ 1～1.5 × 10⁶ 細胞には、500 μl の完全な Digestion buffer を使用する。
 - ・ 3 × 10⁶ 細胞には、1000 μl の完全な Digestion buffer を使用する。
 - ・ 下記のポイント 7 で抽出を行うときの問題を避けるには、バッファを多めに使用することが必要かも知れない。
 - ・ 下記ポイント 5 に進む（細胞の溶解）。

出発材料：細胞溶解前の組織の場合

- 1B. 摘出後できるだけ速やかに、すばやく組織を切り分け、液体窒素で凍結する。
 - ・ 取り出す際、一部の組織には分解酵素が多く含まれることに注意する（肝臓の胆嚢など）。
 - ・ 200 mg から 1 g でスタートし、冷した乳鉢と乳棒ですりつぶす。
- 2B. 上記ポイント 3 で示したように完全な Digestion buffer を調製する。組織 100 mg あたり 1.2 ml の完全な Digestion buffer に粉末組織を懸濁する。
 - ・ 塊になるのを避ける。
 - ・ 使用する出発材料の量に合わせて、容量を調整する。
 - ・ 下記ポイント 5 に進む（細胞の溶解）。

細胞の溶解

5. しっかりとチューブの蓋をしめ、50 で 12 時間から 18 時間振とうしながらインキュベートする。
 - ・ この段階のサンプルには粘性がある。12 時間のインキュベートの後、組織はほとんど見えなくなり、臓器サンプルや組織培養細胞で見られた沈殿物は透明になる。

ステップ 2. 核酸抽出と DNA 精製

6. 等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールでサンプルを入念に抽出する。
 - ・ 1 倍量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) を添加する。
 - ・ 1 倍量とは、約 500 μ l または 1 ml である (上記ポイント 4 参照)。
 - ・ 遠心前に、サンプルをローターで 10 分間、室温でインキュベートすることもできる。穏やかに回転させ、ボルテックスはしない。
 - ・ ドラフト内で作業する。
7. スイングローターで、1,700 \times g 10 分間遠心する。
 - ・ 微量遠心機では、4,700 rpm に相当する。
 - ・ \times g から rpm への変換式はトラブルシューティングガイド参照。
 - ・ 高速で遠心しない。
 - ・ ゲノム DNA なので、超低速でなければならない。
 - ・ 水相が適切に分離しない場合は、proteinase K が入っていない GenDNA Digestion buffer をさらに加え、遠心を繰り返す。
 - ・ 中間層に白い物質がたくさんある場合は、抽出を繰り返す (上記ポイント 6 参照)。
8. 水相 (上層) を新しいチューブに移す。
 - ・ 必要であれば、容量を増やし (上記ポイント 4 参照) ゆっくりとピペットで取る。
 - ・ 次のポイントに進む前に、この段階で、クロロホルム抽出を行うことができる。
 - ・ ドラフト内で作業する。

下記ポイント 9 から 12 の代わりに、透析を行うこともできる。

透析は時間がかかるが、高分子量 DNA のせん断を防ぐことができるという利点がある。

透析は、最低でも 100 倍量の TE (透析外液) に対して 2 回行い、DNA から有機溶媒と塩を除く。また、DNA は粘性が高いので、最低でも 24 時間の透析が必要である。

9. 1/2 量の GenDNA precipitant と 2 倍量の 100% エタノールを添加する。これが、DNA 精製である。
 - ・ 1 倍量は元々の上層の量である。
 - ・ 1 倍量とは、約 500 μ l または 1 ml である (上記ポイント 4 参照)。
 - ・ 1 倍量が 500 μ l の場合、250 μ l の GenDNA precipitant と 1,000 μ l の 100% エタノールを添加する。
 - ・ DNA はすぐに糸状の沈殿を形成する。
10. 1,700 \times g で 5 分間遠心して DNA を回収する。
 - ・ 高速で遠心しない。
 - ・ ゲノム DNA なので、超低速でなければならない。
 - ・ 高塩濃度沈殿剤 (GenDNA precipitant) 存在下での短時間の沈殿操作は、DNA サンプル中の RNA の量を減少させる。DNA を長期間保存する場合は、エタノール存在下で保存するとよい。
11. 沈殿を 70% エタノールでリンスする。エタノールを捨て、沈殿を風乾する。
 - ・ 残存する塩やフェノールを除くために、しっかりとリンスすることが重要である。

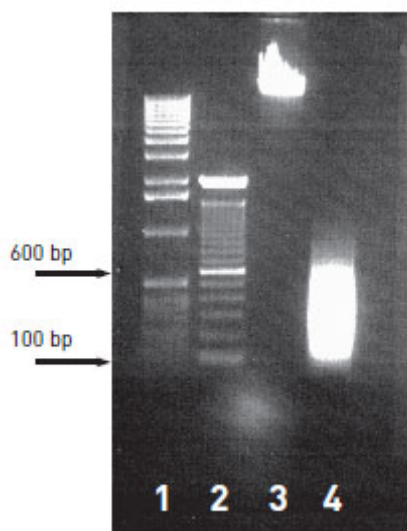
12. DNA の沈殿を ~1 mg/ml となるように GenDNA TE で懸濁して溶解する。溶解を促進するために、室温または 65 で数時間穏やかに振とうする。4 で保存する。
- ・ 1~1.5×10⁶細胞からは、8~12 μg の DNA が得られると思われる (8~12 μl)
 - ・ 3×10⁶細胞からは、20~30 μg の DNA が得られると思われる (20~30 μl)
 - ・ できれば、(材料が十分にある場合は) 30 μg の DNA で操作できるように、少なくとも 30 μg の DNA を得ることを推奨する：DNA 断片化プロトコル参照
13. 必要であれば、この段階で DNA サンプル 1 ml あたり 2 μl の GenDNA RNase(DNase-free)を添加し、37 で1時間インキュベートして、残存 RNA を取り除くことができる。続けてフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行う(上記のポイント6~11と同様に)

DNA 解析

14. DNA 調製の効率を可視化するために、DNA サイズマーカーと一緒にサンプルを 1% アガロースゲルで泳動する(下図レーン 3)。得られた DNA サンプルの断片化効率も同様に示している(レーン 4)。プロトコルと至適条件は、図の解説と次ページに記されている。

Diagenode 社の Bioruptor と GenDNA モジュール：

メチル化 DNA 免疫沈降に使う DNA の調製と DNA の断片化



ゲノム DNA 調製

- ステップ 1のスタート - 3×10⁷細胞使用
- ステップ 1 - 完全な Digestion buffer 500 μl 使用
- ステップ 2 - (フェノール/クロロホルム抽出後)：容量は 350 μl
- ステップ 2の最後 - (沈殿後)：容量は 200 μl
- ステップ 3 - Nanodrop で測定：1.4 μg/μl (OD 260/280 = 1.8)

Bioruptor を使ったゲノム DNA の断片化

Low パワーで 10 分間
15 秒間 “ON” 15 秒間 “OFF” サイクルを使用
サンプル容量 300 μl (1.5 ml チューブ)
DNA 濃度 0.1 μg/μl

1. 分子量マーカー (1 kb)
2. 分子量マーカー (100 bp)
3. ゲノム DNA 調製 (断片化なし、10 μg)
4. 断片化したゲノム DNA (10 μg)：平均サイズ 300 bp

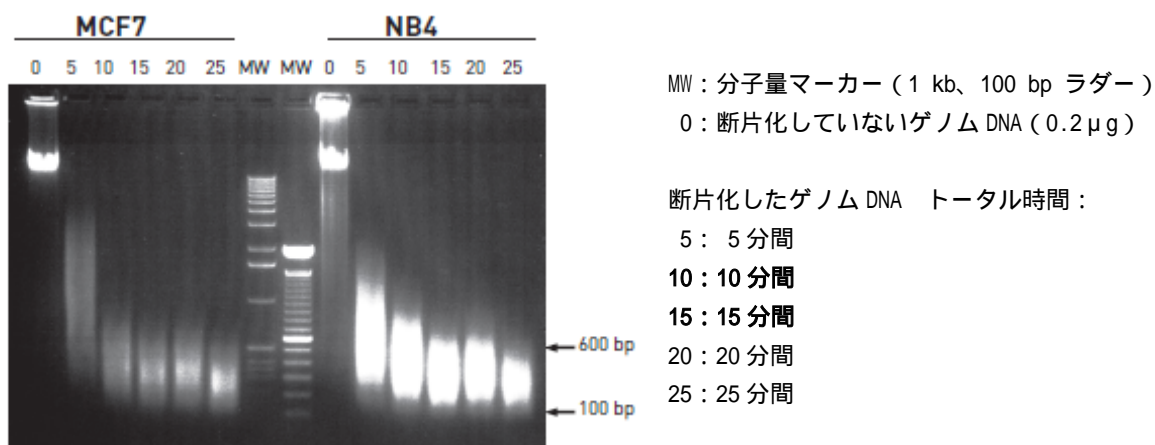
ステップ 3. DNA 断片化

15. 1.5 ml チューブに、DNA サンプルを $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるように GenDNA TE で溶かす。
16. 1.5 ml チューブに、最終容量 $300 \mu\text{l}$ の DNA サンプル ($30 \mu\text{g}$ の DNA) を入れて使用する。
 - ・ 例えば、1 IP を 2 点とインプット (1 IP の 10% に相当) を行う場合、 $24 \mu\text{l}$ の断片化した DNA サンプルが必要になる (メチル化 DNA 免疫沈降ステップ 4、表 4 参照)。
 - ・ サンプルサイズと実施する IP の数に合わせて、スケールは調整する。
17. Bioruptor™ を使って DNA を断片化する (下図参照)。
 - ・ パワー : LOW
 - ・ サイクル : [15 秒間 “ON”、15 秒間 “OFF”]
 - ・ トータル時間 : 10 分間または 15 分間
18. 断片化した DNA を上の写真で示したようにアガロースゲルで解析する。

備考 :

- 自身のサンプルの断片化条件を “各自” で最適化することを推奨する。 “各自” で断片化条件を設定する場合は小さいチューブに少量のサンプル、低濃度 DNA でテストする (下図参照)。
- 期待される DNA 断片のサイズは 300 ~ 500 bp である。

Diagenode 社の Bioruptor と GenDNA モジュール :
メチル化 DNA 免疫沈降に使う DNA の調製と DNA の断片化



Diagenode 社の Bioruptor を使った MCF7 細胞及び NB4 細胞から調製したゲノム DNA の断片化 :

15 秒間《ON》 15 秒間《OFF》のサイクルで、**Low パワーで 10 分間または 15 分間**

サンプル容量 $300 \mu\text{l}$ (1.5 ml チューブ) DNA 濃度 20 ~ 60 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 。

ステップ 4. メチル化 DNA 免疫沈降

19. DNA サンプル抜ききの IP インキュベーションミックスを準備する。

- ・ 次のようにして、(DNA サンプル抜ききの) IP インキュベーションミックスを調製する：- 1/ インプットサンプルは IP のコントロールとして使用され、- 2/ できれば少なくとも 2 点で IP を行うことがベストであり、- 3/ 過剰分も含めて調製する(表 4 の右列を参照)。このミックスには、2 つの DNA 内部 IP コントロール(非メチル化 DNA 及びメチル化 DNA)が含まれている。
- ・ 各 IP を 2 点で行うことを推奨する(表 4 の右列を参照)。
- ・ 表 4 の右列は、2 IP と 10%のインプット分を調製するための IP インキュベーションミックスの量を示している。(最終容量は過剰分を含んでいる。)

表 4. DNA サンプルを添加しない IP インキュベーションミックス

試薬	1 IP+インプットの容量	2 IP 分とインプットサンプルを調製する場合の容量
Water	45 μ l*	90 μ l*
MagBuffer A	24 μ l	48 μ l
MagBuffer B	6 μ l	12 μ l
Positive meDNA control	1.5 μ l	3 μ l
Negative unDNA control	1.5 μ l	3 μ l
トータル容量	78.00 μl	156.00 μl

* : DNA サンプルの濃度が 0.1 μ g/ μ l の場合、1 IP あたり 45 μ l の水を使用する。

DNA サンプルの濃度が 0.1 μ g/ μ l でない場合は、添加する水の量を調整する。1 IP あたりの DNA なしのミックスの量が 78 μ l になるようにする(次のポイント参照)。

20. 新しい 1.5 ml チューブにラベルする。IP インキュベーションミックスに DNA サンプルを添加する(下記参照)。

2 点の IP とインプットを合わせて始める場合：

2 点の IP とインプットは 1 本のチューブに合わせて操作する。

1 本のチューブに：IP インキュベーションミックスを添加する。1 本のチューブに 2.4 μ g の DNA を添加する。

- ・ 濃度が 0.1 μ g/ μ l の DNA を使用する場合：1 チューブあたり、ポイント 19(表 4)で調製した 156 μ l の IP インキュベーションミックスに 24 μ l の DNA サンプルを加える。
- ・ トータル量は 180 μ l で、これは 2 IP 分(2 \times 75 μ l)、10% インプット(7.5 μ l)、過剰量(22.5 μ l)に相当する。
- ・ 濃度が 0.1 μ g/ μ l 以外の DNA を使用する場合：表 4 に記載したように容量を調整する。

代替の方法

個別のサンプルで始める場合：

ラベルした“IP”チューブ：各チューブに IP インキュベーションミックスを添加する。各チューブに 1 μ g の DNA を添加する。

- ・ 濃度が 0.1 μ g/ μ l の DNA を使用する場合：1 チューブあたり、65 μ l の IP インキュベーションミックスと 10 μ l の DNA サンプルを加える。1 IP あたりのトータル量は 75 μ l である。
- ・ 濃度が 0.1 μ g/ μ l 以外の DNA を使用する場合：表 4 に記載したように容量を調整する。

- “インプットサンプル”チューブ：上記で1 IPあたりに使用する量の10%を添加する。
- ・ 濃度が0.1 µg/µlのDNAを使用する場合：1チューブあたり、6.5 µlのIPインキュベーションミックスと1 µlのDNAサンプルを加える。10%インプットのトータル量は7.5 µlである。
 - ・ 濃度が0.1 µg/µl以外のDNAを使用する場合：1 IPあたりの10%の量を使用する。

21. 95 で3分間インキュベートする。

22. 氷上で急冷する（氷水の使用がベストである）。

23. すぐに、4 で軽く遠心する。

24. 2点のIPとインプットを1本のチューブに合わせて操作している場合：はじめに7.5 µlを取り（これが10%インプットになる）ラベルした新しいチューブに移す。
そして残りを、2本の200 µlチューブに75 µlずつ移す。キットについている200 µl tube stripsを使用するか、Magnetic Rackに合う別の200 µlチューブを使用する。
2本のIPチューブは、（ポイント32で次に使用するまで）4 に置いておく。
- ・ インプットサンプルを4 に置いておく。インプットサンプルは出発材料のコントロールとして使用され、IPには使用しない。
- はじめから個別のサンプルで操作している場合は、ポイント25に進む。

ビーズの調製

25. MagBuffer Aを水で1：5に希釈して、ビーズ洗浄バッファを準備する。1 IPあたり必要なビーズ洗浄バッファの量は、約100 µlである。
26. キットに入っているMagbeadsを懸濁し、1 IPあたり11 µlのMagbeadsを新しいチューブに移す。
- ・ 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。
27. チューブを磁石に置くか、遠心して上清を除く。ビーズをキープする。
28. 氷冷したビーズ洗浄バッファで、Magbeadsを2回洗浄する：バッファでビーズを懸濁し、1,300 rpmで5分間遠心し（容量が小さい場合は、代わりにMagnetic Rackを使用する）上清を捨てビーズの沈殿をキープする。
- ・ 2 IPの場合：22 µlのビーズのストック溶液に55 µlのバッファを添加する。
 - ・ 8 IPの場合：88 µlのビーズのストック溶液に220 µlのバッファを添加する。
 - ・ 16 IPの場合：176 µlのビーズのストック溶液に440 µlのバッファを添加する。
- ！！：ピペティングしてビーズを均一にする。ビーズの量の変動すると再現性が低下する。
29. 洗浄後、下に示すように洗浄バッファでビーズを懸濁し、氷上に置く。
- ・ 1 IPあたり、22 µlのビーズ洗浄バッファを添加する。
 - ・ ビーズの凍結厳禁
- ！！：使用前にその都度ビーズを懸濁する。

IPの続き

30. 新しいチューブに、抗体を水で1：2に希釈する。1 µlの抗体を新しいチューブに移し、水を1 µl添加する（2 µlで2 IPから6 IPまで行うことができる）。

31. 1:2 に希釈したフレッシュな抗体を使って、下記表 5 に示したような希釈抗体ミックスを調製する。最初に抗体、MagBuffer A、水を加える。その後、MagBuffer C を添加する。

表 5. 希釈抗体ミックスを調製するための IP 数ごとの試薬容量

試薬	1 IP 分	2 IP 分	4 IP 分	6 IP 分	8 IP 分
抗体 1:2	0.30 μ l	0.75 μ l	1.50 μ l	2.00 μ l	3.00 μ l
MagBuffer A	0.60 μ l	1.50 μ l	3.00 μ l	4.00 μ l	6.00 μ l
水	2.10 μ l	5.25 μ l	10.50 μ l	14.00 μ l	21.00 μ l
MagBuffer C	2.00 μ l	5.00 μ l	10.00 μ l	13.00 μ l	20.00 μ l
最終容量	5.00 μ l	12.50 μ l	25.00 μ l	33.00 μ l	50.00 μ l

- ・ 表中では、最終容量に過剰分が含まれている(1 IP あたり、希釈抗体ミックスは 5 μ l である)。
- ・ その日に行う IP の数に合わせて、スケールは調整する。
- ・ その日に使用しない分は捨てる。
- ・ 使用する抗体の量は重要なので、希釈ステップは省略しない。
- ・ 各自のサンプルと実験に合わせて、抗体の希釈(上げるまたは下げる)を決めることもできるが、キットに入っている抗体は 5 μ l で、それ以上の抗体は別に用意することを覚えておく。ミックスは、添加する抗体の量を基にして、添加する水の量で調節する。

32. 200 μ l の IP チューブ(上記ポイント 24 より)に希釈抗体ミックスを 5 μ l 添加する。

- ・ IP インキュベーションミックスと DNA サンプルが入った IP チューブに、希釈抗体ミックスを添加する。
- ・ 残った希釈抗体ミックスは捨てる。

33. 各 200 μ l IP チューブ(ポイント 32)に 20 μ l の洗浄したビーズ(ポイント 29)を添加して混合する(最終容量: 100 μ l)。

34. 4 で 4 時間または一晩、ローテーターに置いておく。

ステップ 5. 洗浄

35. MagWash Buffer と Magnetic Rack を氷上に置く。氷上または低温室で洗浄を行うのが最適である。
36. IP チューブを氷冷した Magnetic Rack に置いて 1 分間待ち、バッファを捨てる。
37. DNA IP サンプルを次のように 3 回洗浄する：各チューブに 100 μ l の氷冷した MagWash Buffer-1 を添加して蓋を閉め、ビーズが懸濁されるまで 8 連チューブを転倒混和する。ローテーター (40 rpm) で 4、4 分間インキュベートする。スピンドしてから Magnetic Rack に置いて 1 分間待ち、バッファを捨てる。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。
 - ・ 1.5 ml チューブ用の Magnetic Rack で操作している場合、各洗浄には 150 μ l の洗浄バッファを使用する。
38. 100 μ l の氷冷した MagWash buffer-2 で、(上記ポイント 37 で記載したように) 再びビーズを洗浄する。
39. 最後の洗浄後、残った洗浄バッファを (P200 のピペットを使って) 捨てる。ビーズの沈殿は氷上に置き、次のステップに進む。
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 単離

- ・ このステップ以降は、フィルターチップを使用する。
- ・ このステップ以降は、キットに入っている PCR-grade water を使用する。

注意: このキットには、定量 PCR 解析に適した一本鎖 DNA を、簡単に、速く単離するための DNA isolation Buffer が含まれている (ポイント 40~47 参照)。

より伝統的な DNA 精製は、DNA 精製モジュール (Diagenode cat.#: mc-magme-002) と、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールまたはカラム (例えば、Qiaquick) を用いて行うこともできる。この精製方法では、増幅、マイクロアレイ、シーケンスを行える DNA が得られる。

	DNA Isolation buffer	DNA 精製モジュールと (PCIA/カラム)
時間	30 分間	2 時間 30 分間 / 30 分間
DNA 濃度	+	++ / ++ (DNA の濃縮が可能)
DNA のロス	なし	あり
DNA の純度	+	++ / ++
その後の解析	定量 PCR	増幅、マイクロアレイ、シーケンス

40. インプットサンプルを軽く遠心する。ここからは、インプット DNA サンプルと IP サンプルを並行して処理する。
41. 次のように、1 サンプルあたり 100 μ l の完全なバッファ-DIB を調製する: DNA isolation Buffer (DIB) 100 μ l あたり、1 μ l の Proteinase K を添加する。IP DNA サンプルには 100 μ l、インプット DNA サンプルには 92.5 μ l が必要なことを考えて、スケールは調節する。
42. Magnetic Rack からチューブを取り出し、免疫沈降した DNA サンプルに 100 μ l の完全な DIB を添加する。ビーズを懸濁し、1.5 ml チューブに懸濁液を移す。
43. 7.5 μ l のインプット DNA サンプルに 92.5 μ l の完全な DIB を添加する。
44. 免疫沈降した DNA サンプルとインプット DNA サンプルを 55 °C で 15 分間インキュベートする。
45. 次に、全てのサンプルを 100 °C で 15 分間インキュベートする。
46. 4 °C で、14,000 rpm 5 分間遠心する。
47. 上清を新しいチューブに移す。これが、定量 PCR 用の DNA である。-20 °C で保存する。

DNA 精製のための 2 つのオプション

オプション 1 : Diagenode 社の DNA 精製モジュール (Diagenode cat #. mc-magme-002) と QIAquick PCR purification columns (QIAGEN # 28106) を用いた DNA の溶出と精製

1. インプットサンプルを取り、軽く遠心する。ここからは、インプット DNA サンプルと IP サンプルを並行して処理する。
2. Buffer D、E、F を次のように混合して、完全な溶出バッファーを調製する。
 - ・ 右列には 2 IP 分と 10%インプット分を調製するための完全な溶出バッファーの容量が記載してある (最終容量には約 10%の過剰分が含まれる)。

表 6. 完全な溶出バッファー

完全な溶出バッファー	1 IP 分	2 IP 分+10%インプット
Buffer D	103.50 μ l	335 μ l
Buffer E	11.50 μ l	37 μ l
Buffer F	5.00 μ l	16 μ l
トータル容量	120.00 μ l	388 μ l

3. 120 μ l の新鮮な完全な溶出バッファーをビーズの沈殿 (メチル化 DNA IP サンプル) とインプットサンプルに加える。
4. 1,000 ~ 1,300 rpm、65 10 分間、サーモシェーカーでインキュベートする。
5. ここからは、QIAquick の説明書に従う。簡単に説明すると : 600 μ l の PB を加えボルテックスし、サンプルをカラムにのせ、4,000 rpm で 1 分間、遠心する (1 本のカラムに 2 本分のメチル化 DNA IP サンプルを合わせることにもできる)。
6. 700 μ l の PE で洗浄する。4,000 rpm で 1 分間、遠心し、フロースルーを捨てる。
7. 13,000 rpm で 1 分間、遠心する。
8. 50 μ l の TE で溶出する。
 - ・ TE バッファーが pH 8.0 であることを確認する。pH が低いと収量が低下する。
9. 50 で 5 分間インキュベートする。
10. 13,000 rpm で 1 分間、遠心する。

この段階で、精製した DNA が得られる : 1/ 断片化した DNA (インプットサンプル) 2/ メチル化 DNA IP により単離された DNA (メチル化 DNA IP サンプル)。ステップ 7 に進む。

オプション 2 : Diagenode 社の DNA 精製モジュール (Diagenode cat #. mc-magme-002) とフェノール / クロロホルム / イソアミルアルコール抽出を用いた DNA の溶出と精製

1. インプットサンプルを取り、軽く遠心する。ここからは、インプット DNA サンプルと IP サンプルを並行して進める。

2. Buffer D、E、Fを次のように混合して、完全な溶出バッファーを調製する。
- ・ 右列には 2 IP 分と 10%インプット分を調製するための完全な溶出バッファーの容量が記載してある（最終容量には約 10%の過剰分が含まれる）。

表 7. 完全な溶出バッファー

完全な溶出バッファー	1 IP 分	2 IP 分+10%インプット
Buffer D	360 μ l	1188 μ l
Buffer E	40 μ l	132 μ l
Buffer F	16 μ l	53 μ l
トータル容量	416 μ l	1373 μ l

3. 416 μ l の新鮮な完全な溶出バッファーをビーズの沈殿（メチル化 DNA IP サンプル）とインプットサンプルに加える。
4. 1,000~1,300 rpm、65 10 分間、サーモシェーカーでインキュベートする。
5. サンプルを室温に冷まし、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）を加える。遠心する前に、サンプルをローテーターで 10 分間、室温でインキュベートすることもできる。穏やかに回転させる。
6. 室温で、14,000 \times g（13,000 rpm）、2 分間、遠心する。上層を新しい 1.5 ml チューブに移す。
7. 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。
遠心する前に、サンプルをローテーターで 10 分間、室温でインキュベートすることもできる。穏やかに回転させる。
この間に、meDNA-IP co-precipitant を氷上で溶かす。
8. 室温で、14,000 \times g（13,000 rpm）、2 分間、遠心する。上層を新しい 1.5 ml チューブに移す。
9. 1 チューブあたり : 5 μ l のキットに入っている meDNA-IP co-precipitant と 40 μ l の meDNA-IP precipitant を加え、1 ml の氷冷した 100% エタノールを加える。よく混ぜて、-20 で 30 分間放置する。
10. 4 で、14,000 \times g（13,000 rpm）、25 分間、遠心する。上清を慎重に取り除き、沈殿に 500 μ l の氷冷した 70% エタノールを加える。
11. 4 で、14,000 \times g（13,000 rpm）、10 分間、遠心する。上清を慎重に取り除き、残ったエタノールを蒸発させるために、チューブの蓋を開け室温で 30 分間放置する。
エタノールがチューブ壁に残らないようにする。
12. 50 μ l の TE を IP サンプルとインプットサンプルに加える。
DNA を均一に懸濁する。沈殿を溶かすために、室温で 12,000 rpm で 30 分間、シェーカーにチューブを置く。

この段階で、精製した DNA が得られる : 1/ 断片化した DNA（インプットサンプル） 2/ メチル化 DNA 免疫沈降により単離された DNA（メチル化 DNA IP サンプル）。ステップ 7 に進む。

ステップ 7. 免疫沈降した DNA の定量 PCR 解析

メチル化 DNA IP モジュールには、4 タイプの DNA に特異的な 4 つの検証されたプライマーペアが含まれる：

- a: メチル化 DNA コントロール (primer pair #1)
- b: 非メチル化 DNA コントロール (primer pair #2)
- c: メチル化ヒト DNA 領域 (精巢特異的 H2B, TSH2B)
- d: 非メチル化ヒト DNA 領域 (GAPDH promoter)

MagMeDIP Kit で提供されるプライマーペアの詳細については、表 8 を参照：名前、特異性、インプット DNA 及び免疫沈降した DNA の予想される増幅が示されている。

表 8. メチル化 DNA 免疫沈降後に使用する定量 PCR モジュール

プライマーペア (各 10 µM)	特異性	インプット DNA サンプル (コントロールを含む) 増幅:	メチル化 DNA IP (コントロールを含む) 増幅:
hum meDNA primer pair (TSH2B)	ヒト DNA	Yes (サンプルがヒト DNA の場合)	Yes
hum unDNA primer pair (GAPDH)	ヒト DNA		No
meDNA pos control primer pair #1	キットのポジティブ コントロール	Yes	Yes
unDNA neg control primer pair #2	キットのネガティブ コントロール	Yes	No

1. 精製した DNA を次のように希釈し、分注する：

単離 / 精製した DNA (DIB)：

- メチル化 DNA IP と DNA インプットから単離した DNA を使用する (ステップ 6、ポイント 47 -DIB)
 - 100 µl の単離した DNA のうち、5 µl を PCR に使用する (下記参照)。
- 注意：hum meDNA primer pair (TSH2B) をテストする場合：DNA サンプルを 1：1,000 に希釈する。

オプション 1 または 2 で単離 / 精製した DNA：

- メチル化 DNA IP と DNA インプットから単離した DNA を使用する (ステップ 6、オプション 1、2)
- 精製した 50 µl の DNA のうち 10 µl を新しいチューブに移す (40 µl はメチル化 DNA IP-on-chip 解析やその他の PCR 解析用に残しておく)。
- 最初の PCR 解析用：10 µl の精製した DNA サンプル (IP とインプット) に、10 µl の水を加える。最終容量は 20 µl で、5 µl を PCR に使用する (下記参照)。

注意：hum meDNA primer pair (TSH2B) をテストする場合：DNA サンプルを 1：1,000 に希釈する。

2. SYBR Green マスターミックスを使って、定量 PCR ミックスを調製し、定量 PCR の準備をする。
 定量 PCR ミックス (トータル容量 25 μ l / 反応):
- 1.00 μ l のキットに入っている primer pair (ストック: 各 10 μ M: リバースとフォワード)
 - 12.50 μ l のマスターミックス (例: iQ SYBR Green supermix)
 - 5.00 μ l の単離した DNA または希釈した精製 DNA サンプル (DNA の希釈は上記参照)
 - 6.50 μ l の水

表 9. 定量 PCR サイクル

	温度	時間	サイクル
PCR 増幅	95	7 分間	× 1
	95	15 秒間	× 40
	60	60 秒間	
	95	1 分間	× 1
融解曲線	65 で 1 サイクルにつき 0.5 上昇	1 分間	× 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**

- プライマーの相補性及び二次構造は、primer design でテストできる (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)。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 ~ 100 bp) 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/>。遺伝子定量のページには、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 (バリデーション)**

- 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 を増幅するべきである。
- 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⁽¹⁾: $AE = 10^{(-1 / \text{傾き})}$
- 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。

・データの解釈

特定遺伝子座のメチル化 DNA 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 のデータから計算できることができる： $\%(\text{メチル化 DNA IP} / \text{トータルインプット})$

$$\%(\text{メチル化 DNA IP} / \text{トータルインプット}) = 2^{\wedge}[(\text{Ct}(10\% \text{ input}) - 3.32) - \text{Ct}(\text{MeDNA IP})] \times 100\%$$

ここでの 2 は上で算出したように AE (増幅効率)⁽¹⁾である。; Ct (MeDNA IP) と Ct (10% input) は、メチル化 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 threshold 値である;補整因子 (3.32) はインプットの 1:10 希釈を考慮するために使われる。; recovery は $\%(\text{メチル化 DNA IP} / \text{トータルインプット})$ である。

・バックグラウンドの決定

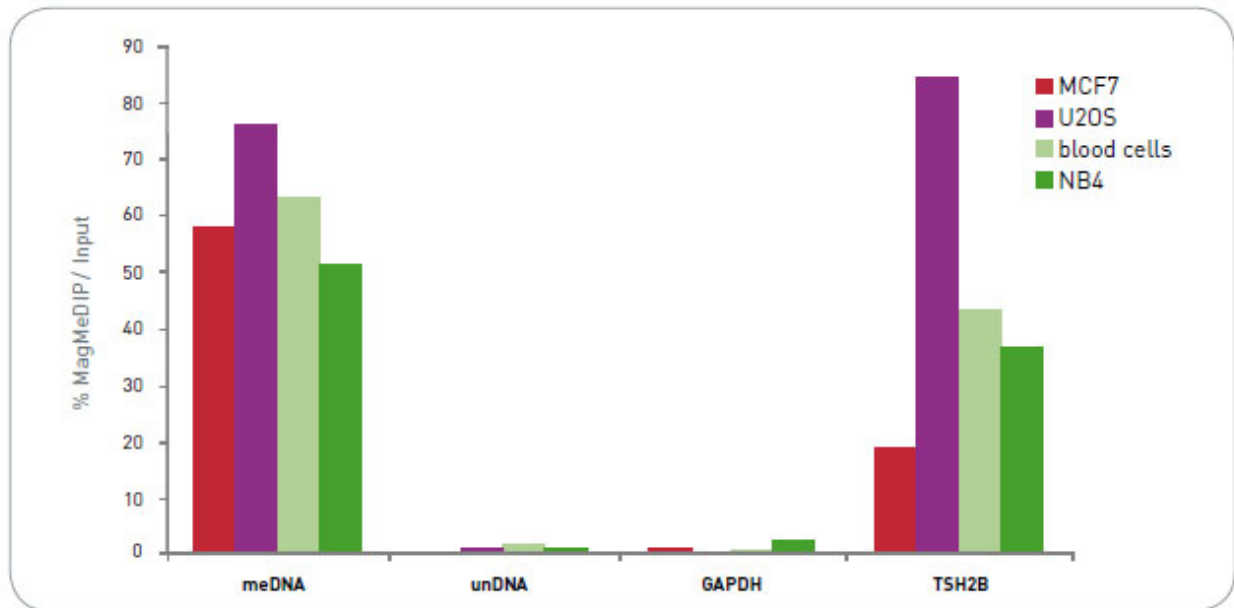
IP の最終目的は同じ IP サンプル中で、非メチル化 DNA (ネガティブ unDNA コントロール) と比較して特異的な DNA 断片 (メチル化 DNA に相当する) がどれほど多いかを算定することである。

・ **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。

$$\text{Occupancy} = \% \text{ input (特定の遺伝子座)} / \% \text{ input (バックグラウンドの遺伝子座)}$$

Relative occupancy は特定の遺伝子座のメチル化の尺度として使われ、IP の特異性についての手がかりとなる。バックグラウンドの遺伝子座は、キットのコントロールの非メチル化 DNA (unDNA neg ctrl 1 または 2) で得られるシグナルに相当する。

MagMeDIP Kit 結果



1/ MagMeDIP Kit を使って得られたメチル化 DNA 免疫沈降の結果

メチル化 DNA 免疫沈降解析は、MCF7 細胞、U2OS 細胞、血液細胞及び NB4 細胞の DNA と MagMeDIP Kit (Diagenode) を用いて行われた。DNA は Gen DNA モジュールで調製された。免疫沈降はキットに含まれる内部コントロールとヒト DNA サンプルと共に行われた。免疫沈降解析に含まれる内部ポジティブ及びネガティブ DNA コントロールは、メチル化 DNA (meDNA) と非メチル化 DNA (unDNA) である。DNA は DIB を用いて単離/精製される。その後、キットに含まれるプライマーペアを用いて、定量 PCR が行われる。

各 “プライマーペア” は特定の DNA をターゲットとし、期待される結果は次の通りである。

- 内部 DNA コントロール
 - “meDNA ”: meDNA Positive control (メチル化のポジティブシグナルが得られる。)
 - “unDNA ”: unDNA Positive control (メチル化 0%のためシグナルは得られない。)
- ヒト DNA サンプル
 - “GAPDH promoter ”: この領域はメチル化されていないので、シグナルは期待されない。
 - “TSH2B ”: 精巣特異的 H2B ヒストン遺伝子。メチル化された領域なので、ポジティブシグナルが期待される。TSH2B 遺伝子は精巣でのみ転写されている。この遺伝子の CpG 部位は全ての体細胞組織でメチル化されているが、精巣ではメチル化されていない。

Diagenode 社のメチル化 DNA IP コントロールは、IP 効率を表している。

追加プロトコール

Methyl DNA IP-on-chip

メチル化 DNA 免疫沈降で得られた DNA は、DNA アレイのハイブリダイゼーションの前に増幅しなければならない。選択した手法は、2003 年に Liu らによって述べられた T7 をもとにしたリニア増幅法である (5)。

トラブルシューティングガイド

ステップ	トラブル	解決方法
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。
細胞の数	ゲノムDNAの調製に必要な細胞の量は重要である。	1 IPあたり1 µgを使用できるようにするため、スタートで十分量の細胞を使う必要があるということを頭に入れておくことが重要である。
DNA 断片化	バッファの構成	キットに入っているバッファを使用する。それらは、鍵となる重要な成分を含み、至適化されている。サンプルは低温に保つ。
断片化したDNAの写真	アガロースゲル上での多量のDNAの移動は、実際のDNAの断片化を反映せず、品質の悪い写真になる。	アガロースゲルに過剰量をロードしない。1 レーンあたり 5 µg 以上ロードしない。 また、サンプルを RNase で処理する。
	アガロース濃度	1%より高濃度のアガロースゲルを使用せず、ゆっくりと泳動する。
	泳動バッファ濃度	アガロースゲル上でスミアを引き起こす 0.5×TAE ではなく、1×TAE 又は 1×TBE を使用することが好ましい。
IPのビーズ	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ルどおりに、穏やかに遠心 (500 ×g、2~3 分間) する。 $g = 11.18 \times r \times (\text{rpm}/1,000)^2$; r は回転半径 (mm)、1.5 ml 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 °C で保存し、凍結しない。
	ビーズの結合能力	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) のモノクローナル抗体、ラット (IgG2c)。
IPの抗体	他の抗体は使用できるか？	このキットは提供した抗体で検証されており、提供した抗体とバッファを共に使用することは必須である。キットの指示に従うこと。
	1 IPあたり使用する抗体量は？	効率的な IP を確実にするためには、プロトコルに書かれているように、希釈した抗体を使用することが重要である。過剰な抗体が特異性の低下をまねくのに対し、抗体の不足は IP 効率低下の原因となる。
PCR	自身のプライマー	- 鎖長：18~24 ヌクレオチド - Tm：60 (±3.0) - % GC：50% (±4%)
	PCRのコントロール： ネガティブコントロールと ポジティブコントロール	ネガティブ PCR コントロール：メチル化されていない DNA 領域に特異的なプライマーを使った PCR (キットのコントロール及びヒト) ポジティブ PCR コントロール：メチル化された DNA 領域に特異的なプライマーを使った PCR (キットのコントロール及びヒト) ポジティブ PCR コントロール：インプット DNA を使った PCR
	メチル化 DNA IP： 定量 PCR プライマーペア	提供した PCR プライマーは、コントロール DNA (非メチル化及びメチル化) と同様に、ヒトの遺伝子座 (非メチル化及びメチル化) をターゲットとしている。
	定量 PCR プライマーは、メチル化 DNA IP 効率の迅速なチェックのために提供する。	
凍結	プロトコル中のいくつかのステップでサンプルを凍結することができる。	- ゲノム DNA - 断片化した DNA - インプット DNA - 免疫沈降した DNA
	凍結融解を避ける。	細胞は瞬間凍結し、氷上で溶かす。

参考資料

1. Pfaffl M.W. 2001 Nucleic Acids Res. 29(9):e45.
2. Rivenbark et al. 2006 Laboratory Investigation, 86:1233-42.
3. Ai et al. 2006 Cancer Res 66:7899-909.
4. Osanai et al. 2007 Cancer Sci. 98(10):1557-62.
5. Liu C.L., Schreiber S.L. and Bernstein B.E. 2003 BMC Genomics 4(1):1-11.
6. Choi YC, Chae CB, J Biol Chem. 1991 Oct 25 ; 266 (30) :20504-11 ; Choi YC et al. DNA Cell Biol, 1996, 15 (6) : 495-504

お問い合わせ

Diagenode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: HTInfo@diagenode.comTH

Diagenode Inc. USA

376 Lafayette Road, Suite 202

Sparta, NJ 07871

Phone: +1 973 300 0976

Fax: +1 973 300 1862 +1

Email: infousa@diagenode.com

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