

**MagMeDIP Kit 簡易プロトコール**(version 01) 詳細については Instruction Manual を参照  
(Code No. 311-81001)

**キット内容 (10 回分)**

GenDNAモジュール		
内容	容量	保存温度
GenDNA Digestion Buffer	3 ml	4°C
GenDNA Proteinase K (200x)	300 μg/15 μl	-20°C
GenDNA precipitant	3 ml	4°C
GenDNA TE	3 ml	4°C
GenDNA RNase (DNase free)	5 μg/10 μl	-20°C

メチル化DNA IPモジュール		
内容	容量	保存温度
Magbeads	150 μl	4°C 凍結厳禁
Water	2 ml	4°C
MagBuffer A	2 ml	4°C
MagBuffer B	100 μl	4°C
MagBuffer C	40 μl	-20°C
Antibody anti-5meC	5 μl	-20°C (-80°C)
meDNA Positive control	20 μl	-20°C
unDNA Negative control	20 μl	-20°C
MagWash buffer-1	6 ml	4°C
MagWash buffer-2	4 ml	4°C
DNA isolation Buffer (DIB)	4 ml	4°C
Proteinase K	40 μl	-20°C
Primer pair #1 (meDNA control)	50 μl	-20°C
Primer pair #2 (unDNA control)	50 μl	-20°C
hum meDNA primer pair (TSH2B)	50 μl	-20°C
hum unDNA primer pair (GAPDH)	50 μl	-20°C
200 μl tube strips	2	室温
Cap strips	2	室温

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
<ul style="list-style-type: none"> <li>ラボ用手袋(すべての操作で着用)</li> <li>オートクレーブ滅菌済みのピペットチップ</li> <li>RNase/DNase-free の1.5 ml (または 2 ml) チューブ</li> <li>その他のチューブ: PCR チューブ及び 50 ml コニカルチューブ</li> <li>トリプシン-EDTA</li> <li>氷冷した PBS/バッファ</li> <li>水</li> <li>定量PCR試薬</li> <li>アガロース及びTAEバッファ</li> <li>DNA分子量マーカー</li> </ul>
(ステップ 6でオプション 1のプロトコールを使用する場合) <ul style="list-style-type: none"> <li>DNA 精製モジュール (Diagenode cat #:mc-magme-002)</li> <li>QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN #:28104、#28106)</li> </ul>
(ステップ 6でオプション 2のプロトコールを使用する場合) <ul style="list-style-type: none"> <li>DNA 精製モジュール (Diagenode cat #:mc-magme-002)</li> <li>フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1)</li> <li>クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1)</li> <li>100% エタノール</li> <li>70% エタノール</li> </ul>
装置
<ul style="list-style-type: none"> <li>Magnetic Rack (ニッポンジーン Code No.314-80751)</li> <li>冷却遠心機 (1.5 ml及び 50 ml チューブ用)</li> <li>ローテーター (4°C)</li> <li>ボルテックスミキサー</li> <li>サーモミキサー (55°C、95°C)</li> <li>定量PCR装置</li> <li>アガロースゲル電気泳動装置</li> <li>セルカウンター</li> <li>密閉式超音波細胞破碎装置 Bioruptor™ *</li> <li>ドラフト</li> </ul>
* : Bioruptor™はコスモ・バイオから販売されています。

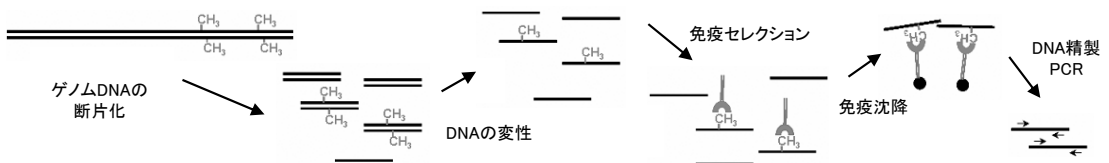
**出発材料**

培養細胞 又は 組織

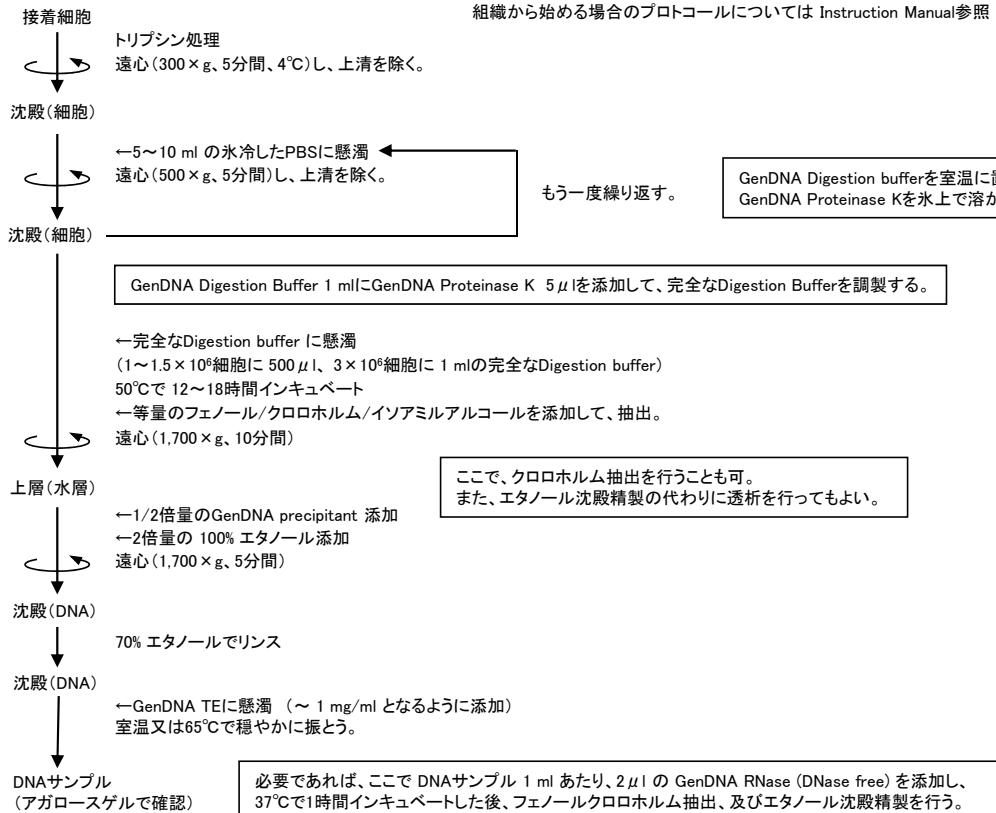
**MagMeDIP Kitのタイムスケジュール**

工程	日程	所要時間
DNA調製	ステップ 1 細胞の回収と溶解	1日目 40分間＋一晚インキュベーション
	ステップ 2 核酸抽出とDNA精製	2日目 数時間
	DNA解析	
メチル化DNA免疫沈降	ステップ 3 DNA断片化	2日目 20分間
	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)
	又は	
	ステップ 4 メチル化DNA 免疫沈降	2日目 1.5時間＋一晚インキュベーション
DNA解析	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)
	ステップ 7 定量PCR	2日目または3日目または4日目 3時間

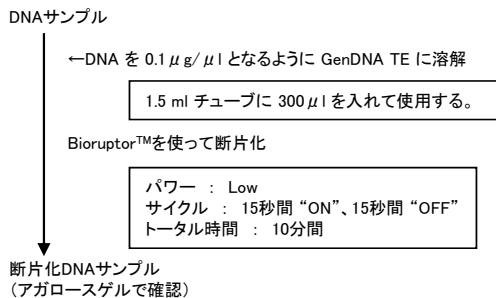
**キットの概要**



## ステップ 1及び2 - メチル化DNA 免疫沈降のためのゲノムDNAの調製



## ステップ 3 - DNA 断片化



## ステップ 4及び 5 - メチル化DNAの免疫沈降と洗浄

●DNAサンプル抜きの IPインキュベーションミックスを調製する(DNA濃度が0.1 μg/μl の場合)。

試薬	1 IP + インプット分	2 IP + インプット分
Water	45 μl	90 μl
MagBuffer A	24 μl	48 μl
MagBuffer B	6 μl	12 μl
Positive meDNA control	1.5 μl	3 μl
Negative unDNA control	1.5 μl	3 μl
<b>トータル容量</b>	<b>78 μl</b>	<b>156 μl</b>

## ステップ 4及び 5 - メチル化DNAの免疫沈降と洗浄 - 続き

- **2 IP とインプットを混合してスタートする場合 (推奨)** 個別のサンプルで始める場合のプロトコールについては Instruction Manualを参照

DNA抜ききのIPインキュベーションミックス ( 2 IP + インプット分 ) を 1.5 ml チューブに入れる。

← 2.4  $\mu\text{g}$  分のDNA添加 (0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNAの場合 24  $\mu\text{l}$ )  
95°Cで3分間インキュベート  
氷上で急冷 (氷水の使用がベスト)  
軽くスピニングする。

7.5  $\mu\text{l}$  (10% インプット)  
75  $\mu\text{l}$  ずつ 2本の200  $\mu\text{l}$  チューブに分注し、次に使用するまで4°C保存  
ステップ 6まで 4°C保存

### ● ビーズの調製

MagBuffer Aを5倍希釈する (ビーズ洗浄バッファー: 1IPあたり約100  $\mu\text{l}$  必要)。

\*: ビーズの凍結厳禁  
\*: ビーズをピペットでとるときは、必ず懸濁してからとる。

必要量のMagbeadsを新しいチューブに移す (1 IPあたり、11  $\mu\text{l}$  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: 2 IPの場合、22  $\mu\text{l}$  のビーズに55  $\mu\text{l}$  のビーズ洗浄バッファーを添加する。)

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

もう一度繰り返す。  
(ビーズの洗浄)

沈殿 (ビーズ)

1 IPあたり22  $\mu\text{l}$  のビーズ洗浄バッファーで、ビーズを懸濁する。

### ● IPの続き

抗体を2倍希釈する (抗体 1  $\mu\text{l}$  + Water 1  $\mu\text{l}$ )。  
抗体ミックスを調製する (下表)。

\*: 希釈した抗体はすぐに使い、残ったら捨てる。

試薬	1 IP 分	2 IP 分	4 IP 分	6 IP 分	8 IP 分
2倍希釈した抗体	0.3 $\mu\text{l}$	0.75 $\mu\text{l}$	1.5 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$	3 $\mu\text{l}$
MagBuffer A	0.6 $\mu\text{l}$	1.5 $\mu\text{l}$	3 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$	6 $\mu\text{l}$
Water	2.1 $\mu\text{l}$	5.25 $\mu\text{l}$	10.5 $\mu\text{l}$	14 $\mu\text{l}$	21 $\mu\text{l}$
MagBuffer C	2 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	13 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$
トータル容量	5 $\mu\text{l}$	12.5 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$	33 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$

DNAを添加した IPインキュベーションミックス 75  $\mu\text{l}$  (1 IP 分: 200  $\mu\text{l}$  チューブ)

← 5  $\mu\text{l}$  の抗体ミックスを添加。  
← 20  $\mu\text{l}$  の洗浄したビーズを添加。

ローターにセットし、4°Cで4時間又は一晩インキュベート

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

ビーズ (沈殿)

← 氷冷したMagWash Buffer-1を100  $\mu\text{l}$  添加し、転倒混和。  
ローター (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)

ビーズ (沈殿)

← 氷冷したMagWash Buffer-2を100  $\mu\text{l}$  添加し、転倒混和。  
ローター (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。

IPサンプル (ビーズ)  
ステップ 6 へ

## ステップ 6 - DNA 単離

ここからは、IPサンプルとインプットサンプルを並行して進める。

DNA isolation Buffer (DIB) 100  $\mu$ l に Proteinase K 1  $\mu$ l を添加して、完全なDIBを調製する。

IPサンプル(ビーズ)、インプットサンプル (ステップ 5から)

- ←IPサンプル(ビーズ)に100  $\mu$ l の完全なDIB添加。
- ←インプットサンプルに92.5  $\mu$ l の完全なDIB添加。
- 55°C 30分間インキュベート
- 100°C 15分間インキュベート
- 14,000 rpm、5分間、4°C

上清を新しいチューブに移す(定量PCR用DNA)。

ステップ7へ

### オプション 1: Diagenode社のDNA精製モジュールとQIAquick PCR Purification Kit を使った溶出と精製

完全溶出バッファーを調製する。

試薬	1 IP分	2 IP + インプット分
Buffer D	103.5 $\mu$ l	335 $\mu$ l
Buffer E	11.5 $\mu$ l	37 $\mu$ l
Buffer F	5 $\mu$ l	16 $\mu$ l
トータル容量	120 $\mu$ l	388 $\mu$ l

IPしたビーズ、インプットサンプル

- ←各チューブに 120  $\mu$ l のフレッシュな完全溶出バッファー添加
- 65°Cのサーモシェーカーで10分間インキュベート

ここからは QIAquick の説明書にしたがう。

- ←600  $\mu$ l の Buffer PB添加、ボルテックスカラムにアプライ
- 遠心(4,000 rpm、1分間)し、フロースルーを捨てる。
- ←700  $\mu$ l の Buffer PE 添加
- 遠心(4,000 rpm、1分間)し、フロースルーを捨てる。
- 遠心(13,000 rpm、1分間)
- カラムを新しいチューブにセット
- ←50  $\mu$ l のTE (pH 8.0) 添加
- 50°Cで5分間インキュベート
- 遠心(13,000 rpm、1分間)

精製DNAサンプル

- 1/ 断片化したDNA (インプットサンプル)
- 2/ メチル化DNA IPで分離されたDNA (メチル化DNA IPサンプル)

ステップ 7へ

### オプション 2: Diagenode社のDNA精製モジュールとフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを使った溶出と精製

完全溶出バッファーを調製する。

試薬	1 IP分	2 IP + インプット分
Buffer D	360 $\mu$ l	1,188 $\mu$ l
Buffer E	40 $\mu$ l	132 $\mu$ l
Buffer F	16 $\mu$ l	53 $\mu$ l
トータル容量	416 $\mu$ l	1,373 $\mu$ l

IPしたビーズ、インプットサンプル

- ←各チューブに 416  $\mu$ l のフレッシュな完全溶出バッファー添加
- 65°Cのサーモシェーカーで10分間インキュベート

サンプルを室温に冷ます。

- ←等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール添加、混合
- 遠心(14,000  $\times$  g、2分間、室温)

上層(水層)

- ←等量のクロロホルム/イソアミルアルコール添加、混合
- 遠心(14,000  $\times$  g、2分間、室温)

上層(水層)

- ←5  $\mu$ l の meDNA-IP co-precipitant 添加
- ←40  $\mu$ l の meDNA-IP precipitant 添加、混合
- ←1 mlの氷冷した100% エタノール添加、混合
- 20°Cに30分間放置

- 遠心(14,000  $\times$  g、25分間、4°C)

沈殿

- ←500  $\mu$ l の氷冷した 70% エタノール添加
- 遠心(14,000  $\times$  g、10分間、4°C)

沈殿

風乾 (チューブの蓋を開け、室温で30分間放置)

- ←50  $\mu$ l の TE (pH 8.0) 添加
- 室温のシェーカーで30分間インキュベート

精製DNAサンプル

- 1/ 断片化したDNA (インプットサンプル)
- 2/ メチル化DNA IPで分離されたDNA (メチル化DNA IPサンプル)

ステップ 7へ

## ステップ 7 - 免疫沈降したDNAの定量PCR解析

定量PCRの詳細はInstruction Manualを参照

反応液 (1反応)

マスターミックス	12.5 $\mu$ l
Primer pair	1 $\mu$ l
Water	6.5 $\mu$ l
DNAサンプル	5 $\mu$ l
トータル量	25 $\mu$ l

サイクル条件

95°C	7分間
95°C	15秒間
60°C	60秒間

}  $\times$  40サイクル

検出

SYBR Green



データ解析へ