

METHYL Kit 簡易プロトコール(version 01) 詳細については Instruction Manual (英文、又は日本語訳)を参照
(Code No. 316-80711)

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)	15 µl	-20°C
GenDNA precipitant	3 ml	4°C
GenDNA TE	3 ml	4°C
GenDNA RNase (DNase free)	10 µl	-20°C

メチル化DNA免疫沈降(メチル化DNA IP)モジュール		
内容	容量	保存温度
meDNA-IP blocked beads	300 µl	4°C (凍結厳禁)
Water	2 ml	4°C
Buffer A	300 µl	4°C
Buffer B	100 µl	4°C
Buffer C	40 µl	(4°C)/-20°C
Antibody anti-5meC (3x)	5 µl	-20°C/(-80°C)
Positive meDNA control	20 µl	-20°C
Negative unDNA control	20 µl	-20°C
Wash buffer-1	12 ml	4°C
Wash buffer-2	10 ml	4°C
Wash buffer-3	10 ml	4°C
Wash buffer-4	12 ml	4°C
Buffer D	6 ml	4°C
Buffer E	1 ml	4°C(室温)
Buffer F	500 µl	4°C
meDNA-IP TE	5 ml	4°C
meDNA-IP co-precipitant	100 µl	-20°C
meDNA-IP precipitant	1 ml	4°C

定量PCRモジュール (定量PCR用プライマー)		
内容	容量	保存温度
hum meDNA	50 µl	-20°C
primer pair (AlphaX1)		
hum unDNA	50 µl	-20°C
primer pair (GAPDH)		
meDNA positive control	50 µl	-20°C
primer pair #1		
meDNA positive control	50 µl	-20°C
primer pair #2		
unDNA negative control	50 µl	-20°C
primer pair #1		
unDNA negative control	50 µl	-20°C
primer pair #2		

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	

スターティングマテリアル

培養細胞 又は 組織

キット以外に必要なもの

試薬・消耗品

- ・ラボ用手袋(すべての操作で着用)
- ・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 (及び 2 ml) チューブ
- ・その他のチューブ: PCR チューブ, 15 ml 及び 50 ml コニカルチューブ
- ・トリプシン-EDTA
- ・氷冷した PBSバッファー
- ・水
- ・フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1)
- ・クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1)
- ・100% エタノール
- ・70% エタノール
- ・定量PCR試薬
- ・アガロース
- ・TAEバッファー
- ・DNA分子量マーカー

(ステップ2でオプション1のプロトコールを使用する場合のみ)
・QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN #28104、#28106)

装置

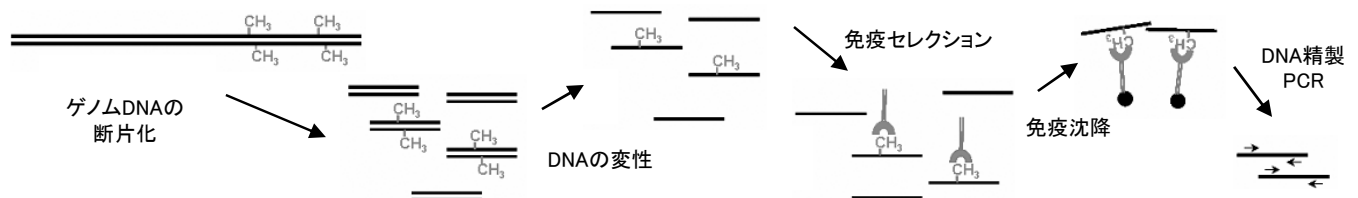
- ・冷却遠心機(1.5 ml チューブ用)
- ・遠心機(15 ml 及び 50 ml チューブ用)
- ・振とう台
- ・セルカウンター
- ・密閉式超音波細胞破碎装置 Bioruptor™ *
- ・ローテーター
- ・ドラフト
- ・ボルテックスミキサー
- ・サーモミキサー (50°C、65°C)
- ・インキュベーター(37°C)
- ・微量遠心機とローテーターのある低温室
- ・定量PCR装置
- ・アガロースゲル電気泳動装置

* : Bioruptor™はコスモ・バイオから販売されています。

METHYL Kitのタイムスケジュール

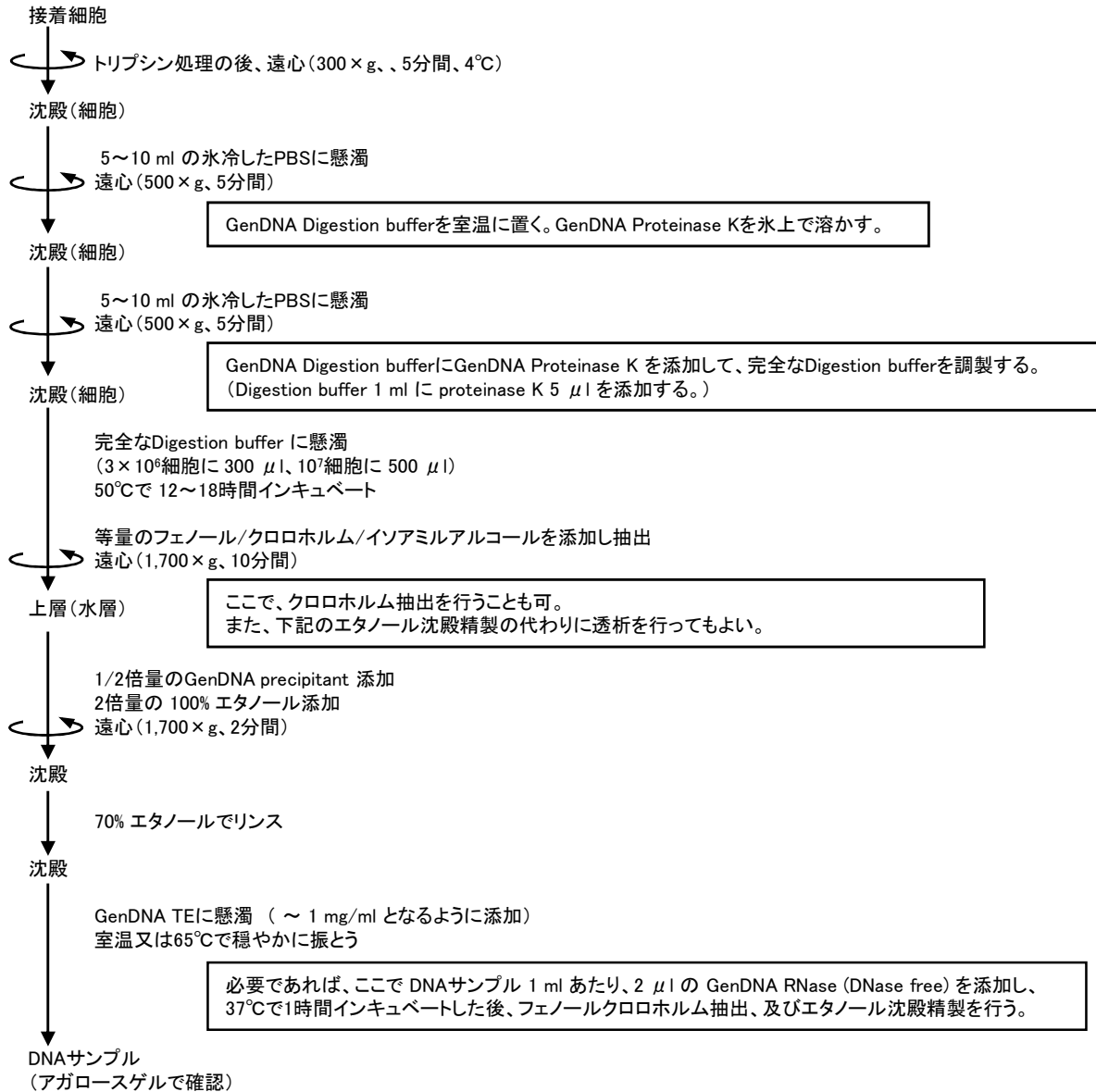
DNA調製: GenDNAモジュール	日程	所要時間
1/ ステップ 1 培養細胞と溶解	1日目	40分間 + 一晩
ステップ 2 核酸の抽出と核酸精製	2日目	数時間
ステップ 3 DNA解析		
2/ DNA断片化	2日目	20分間
メチル化DNA免疫沈降:メチル化DNA IPモジュール		
ステップ1 1. 免疫沈降	2日目	5時間
2. ビーズの洗浄	2日目	1時間
ステップ2 DNAの溶出と精製	2日目	30分間 (又は5時間)
又は		
ステップ1 1. 免疫沈降	2日目	1時間 + 一晩
2. ビーズの洗浄	3日目	1時間
ステップ2 DNAの溶出と精製	3日目	30分間 (又は5時間)
免疫沈降したDNAの解析: 定量PCRモジュール		
ステップ3 定量PCR	2日目 又は3日目 又は4日目	3時間

キットの概要

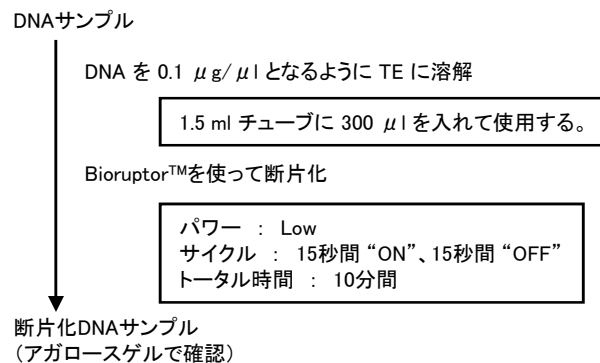


メチル化DNA IPのためのゲノムDNAの調製

組織から始める場合のプロトコールについては Instruction Manualを参照



DNA 断片化プロトコールと Bioruptor™ を使った至適化



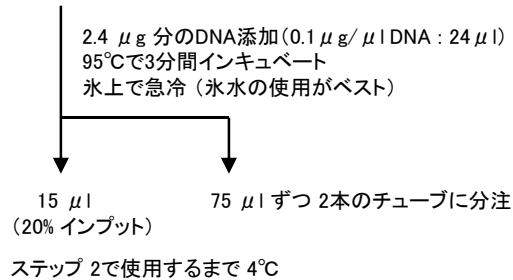
ステップ 1:メチル化DNAの免疫沈降と洗浄

- 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 (DNA濃度が $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の場合)。

試薬	1 IP 分	2 IP + インプット 分
Water	37.5 μl [47.5 μl - 10 μl (DNA 1 μg 分の容量)]	90 μl [114 μl - 24 μl (DNA 2.4 μg 分の容量)]
Buffer A	20 μl	48 μl
Buffer B	5 μl	12 μl
positive meDNA control	1.25 μl	3 μl
negative meDNA control	1.25 μl	3 μl
トータル容量	65 μl	156 μl

- 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

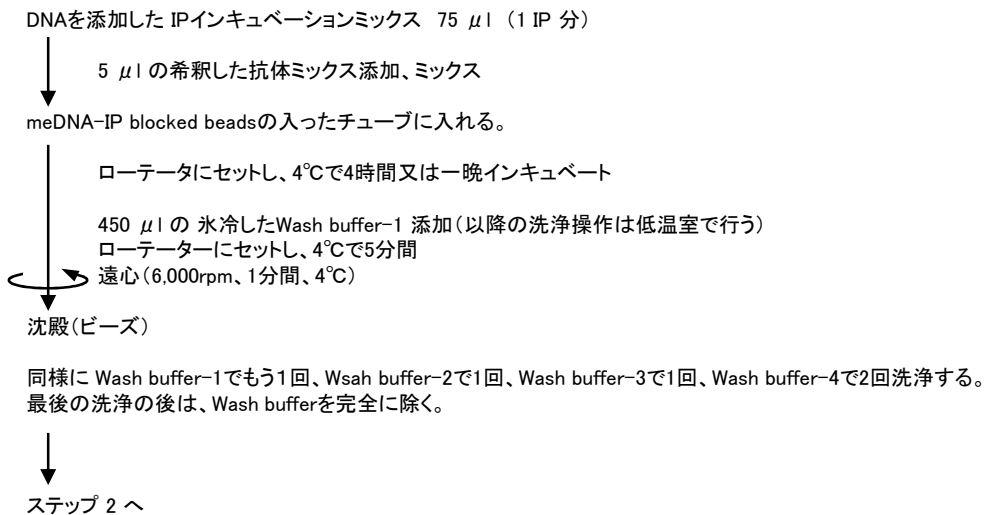
DNA抜ききのIPインキュベーションミックス (2 IP + インプット分) を 1.5 ml チューブに入れる。



- 20 μl の meDNA-IP blocked beads を新しい 1.5 ml チューブに入れる。(使用するまで氷上に置いておく。)

- 新しい 1.5 ml に 希釈した抗体ミックスを調製する。(必要量 + 過剰分)

試薬	1 IP 分	4 IP 分	10 IP 分
Antibody anti-5meC (3x) (キットに入っているもの)	0.3 μl	1.5 μl	4 μl
Buffer A	0.6 μl	3 μl	8 μl
Water	2.1 μl	10.5 μl	28 μl
Buffer C	2 μl	10 μl	27 μl
トータル容量	5 μl	25 μl	67 μl

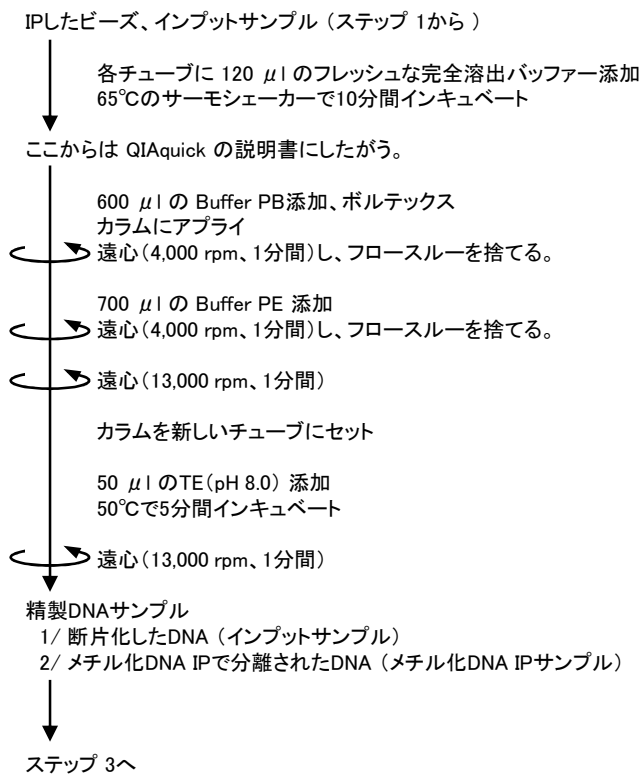


ステップ 2: DNA の溶出と精製

オプション 1: 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。

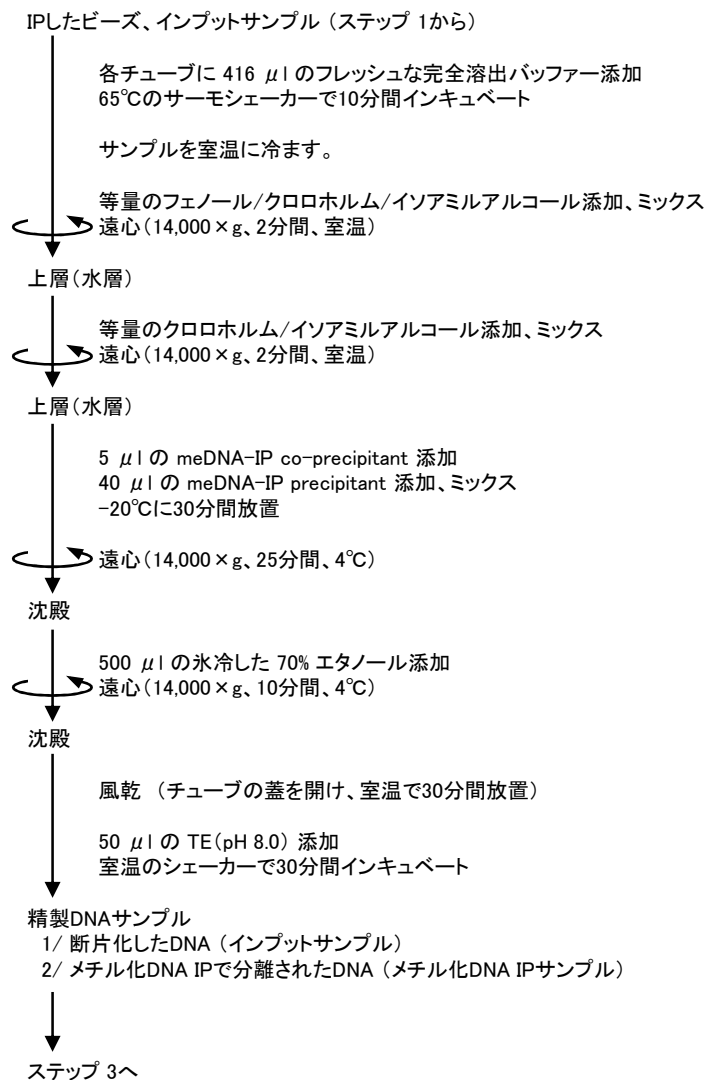
試薬	1 IP分	2 IP + インプット分
Buffer D	103.5 μ l	335 μ l
Buffer E	11.5 μ l	37 μ l
Buffer F	5 μ l	16 μ l
トータル容量	120 μ l	388 μ l



オプション 2: 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 μ l	1,188 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	1,373 μ l



ステップ 3 - 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 μ l
Primer pair	1 μ l
Water	6.5 μ l
DNAサンプル	5 μ l
トータル量	25 μ l

サイクル条件

95°C	7分間	} \times 40サイクル
95°C	15秒間	
60°C	60秒間	

検出

SYBR Green

データ解析へ

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