



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

KIT KEY WORDS:

CORRELATION between IP d MATERIAL and METHYLATION STATUS.

**HIGHLY SPECIFIC. ALL IN ONE TUBE. DNA INTERNAL IP CONTROLS PROVIDED.
EACH IP is QUALITY controlled. RELIABLE, FAST and USER-FRIENDLY. NOVEL.**

メチル化 DNA 免疫沈降キット

METHYL Kit™

NIPPON GENE Code No. 316-80711
(Diagenode Catalog #: mc-green-003)

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

このマニュアルは、Diagenode社のMETHYL 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

目次		ページ
1.	はじめに	3
2.	キットの概要	4
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	6
	キットのモジュールとプロトコールの概要（タイムテーブル）	7
4.	キットのアッセイプロトコール	8
	スターティングマテリアル 培養細胞 又は 組織	8
	1/ メチル化 DNA 免疫沈降のための DNA 調製（GenDNA モジュール）	9
	2/ DNA断片化プロトコールとBioruptor™を使った至適化	13
	メチル化 DNA 免疫沈降（メチル化 DNA IP）	15
	ステップ 1 メチル化 DNA の免疫沈降と洗浄	15
	ステップ 2 DNA の溶出と精製	21
	ステップ 3 免疫沈降した DNA の定量 PCR 解析	24
	Methyl Kit の結果	27
5.	追記プロトコール：メチル化 DNA IP on chip とその結果	28
6.	トラブルシューティングガイド	29
7.	参考資料	30
8.	お問い合わせ	30

1. はじめに

Diagenodeの新しいMETHYL Kitは、メチル化DNA免疫沈降（メチル化DNA IP）のために設計されています。このキットでは、サンプルのDNA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、すべて1チューブで行うことができます。

この新しいメチル化DNA IP法では、あなたのDNAサンプルと一緒に使用することのできるメチル化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、特異性が高く、各IPは品質が管理されており、これは信頼性のある結果の重要な鍵となります。そして、本キットを使った解析は速くて、ユーザーフレンドリーです。

METHYL Kitには、ゲノムDNA調製、メチル化DNAの免疫沈降、免疫沈降（IP）したDNAの定量PCR解析、に使用する3つのモジュールが含まれており、各モジュールには調製済みのバッファーと詳細なプロトコールが用意されています。

GenDNAモジュールは、メチル化DNA IP用のDNAを調製するために至適化されており、DNA断片化のための至適化されたプロトコールも提供されます。

メチル化DNA IPモジュールでは、抗5-methyl Cytidine抗体と、meDNA及びunDNAの内部IPコントロールが提供されます。Diagenodeの抗体、バッファー、プロトコールを使ったIPは、メチル化DNAを特異的に選択し、沈降するために至適化されています。内部コントロールの使用によって、IPの有効性をダブルチェックすることができます。

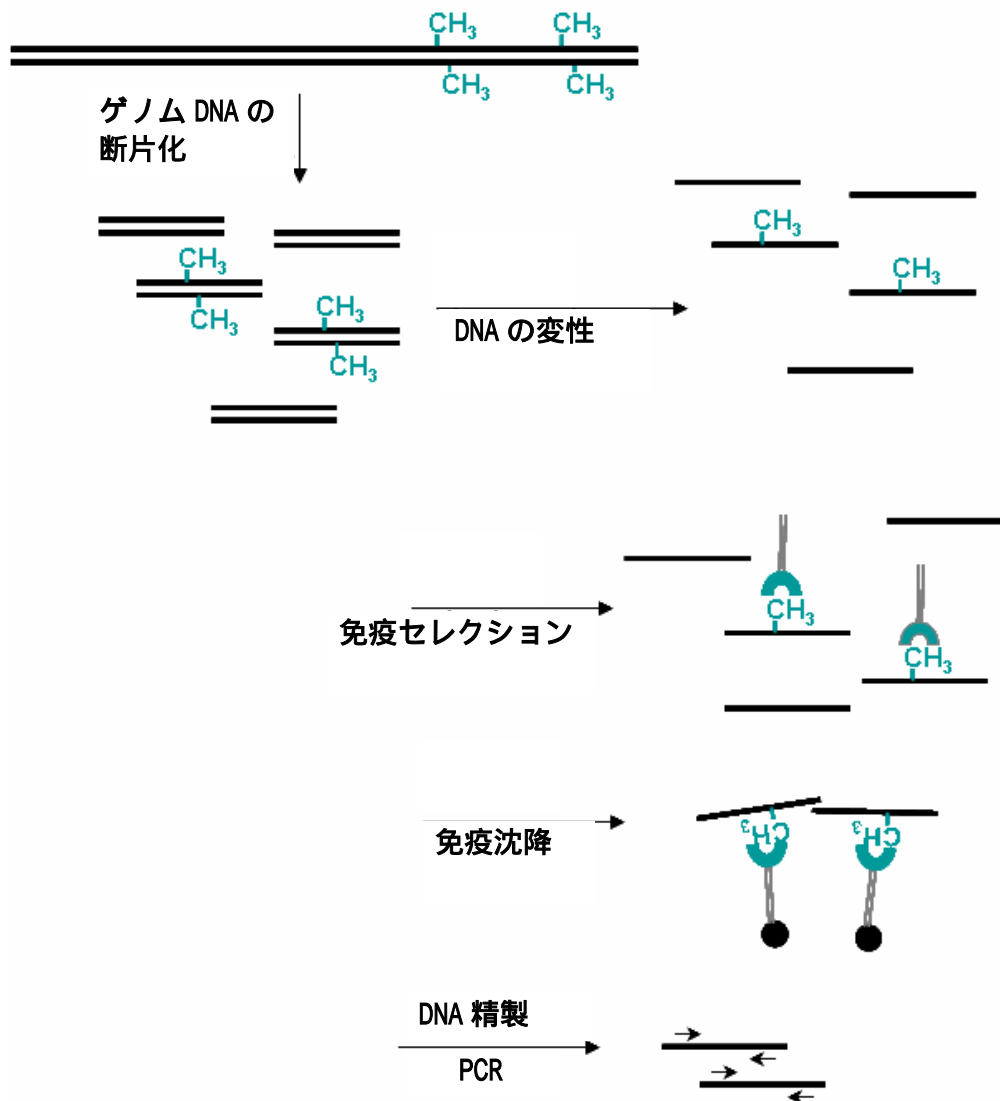
定量PCRモジュールには、4タイプのDNA（*a*:メチル化DNAコントロール（meDNA ポジティブコントロール #1 及び#2）、*b*:非メチル化DNAコントロール（unDNA ネガティブコントロール #1 及び#2）、*c*:メチル化ヒトDNA領域（X-linked alpha satellites）、*d*:非メチル化ヒトDNA領域（GAPDH promoter））に特異的な検証済みのプライマーペアが含まれています。

このマニュアルの次の数ページには、方法の概要、内容、詳細なプロトコールがあり、マニュアルの最終章には、このキットで得られた結果が示されています。また、トラブルシューティングガイドと追記プロトコールは、マニュアルの最後にあります。

1 フォーマット : 1 キットあたり 10 IP

DNAのメチル化についてさらに知りたい場合は、英文マニュアルp33 ページ~の「DNA METHYLATION, CANCER AND METHODS OVERVIEW」をご覧ください。

2. キットの概要



Diagenode の METHYL Kit には、IP 用ゲノム DNA の調製 (GenDNA モジュール)、メチル化及び非メチル化 DNA コントロール (免疫沈降するポジティブ meDNA コントロール、及び免疫沈降しないネガティブ unDNA コントロール) を含む、メチル化 DNA の免疫沈降 (メチル化 DNA IP モジュール)、定量 PCR (qPCR モジュール) の 3 つのモジュールが含まれます。

キットには、細胞の回収から定量 PCR まで、10 回のメチル化 DNA IP アッセイを行うのに十分な試薬が入っており、各モジュールでは、メチル化 DNA の特異的な免疫セレクションと免疫沈降に至適化されたバッファーとプロトコールが提供されます。

キットのキーワード：

免疫沈降したものとメチル化状態の相関、高い特異性、すべて 1 チューブ、DNA 内部 IP コントロールの提供、各 IP の品質の管理、信頼性、速い、ユーザーフレンドリー、新しい。

3. キットの構成

キット内容

キットには、細胞の回収から定量 PCR まで、10 回のメチル化 DNA 免疫沈降（メチル化 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

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
- アガロース及び 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 又は #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™（Diagenode cat # UCD-200）*
- ローテーター
- ドラフト
- ボルテックスミキサー
- サーマミキサー（50、65）
- インキュベーター（37）
- 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

*：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™（catalog # UCD-200）は日本では販売しておりません。

キットのモジュール

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	保存温度
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 (200x)	-	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)	-	10 µl	-20

メチル化 DNA 免疫沈降 (メチル化 DNA IP) モジュール			
内容	コメント	容量	保存温度
meDNA-IP blocked beads	1:2 懸濁液 (10 IP 用)、 0.02%のアジ化物が含まれます。	300 µl	4 凍結厳禁
Water	-	2 ml	4
Buffer A	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。	300 µl	4
Buffer B	-	100 µl	4
Buffer C	-	40 µl	(4) / -20
Antibody anti-5meC (3x)	使用前に 3 倍に希釈する。	5 µl	-20 / (-80)
Positive meDNA control	メチル化 DNA コントロール	20 µl	-20
Negative unDNA control	非メチル化 DNA コントロール	20 µl	-20
Wash 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。	12 ml	4
Wash buffer-2	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。	10 ml	4
Wash buffer-3	界面活性剤ミックスとイオンキレート剤ミックスが含まれます。	10 ml	4
Wash buffer-4	イオンキレート剤ミックスが含まれます。	12 ml	4
Buffer D	-	6 ml	4
Buffer E	界面活性剤が含まれます。 使用する 1 時間前に室温に置いてください。	1 ml	4 / (室温)
Buffer F	塩が含まれます。	500 µl	4
meDNA-IP TE	イオンキレート剤が含まれます。	5 ml	4
meDNA-IP co-precipitant	-	100 µl	-20
meDNA-IP precipitant	-	1 ml	4

定量 PCR モジュール			
内容	コメント	容量	保存温度
hum meDNA primer pair (AlphaX1)	各 10 µM (フォワード & リバースプライマー)	50 µl	-20
hum unDNA primer pair (GAPDH)	各 10 µM (フォワード & リバースプライマー)	50 µl	-20
meDNA positive control primer pair #1	各 10 µM (フォワード & リバースプライマー)	50 µl	-20
meDNA positive control primer pair #2	各 10 µM (フォワード & リバースプライマー)	50 µl	-20
unDNA negative control primer pair #1	各 10 µM (フォワード & リバースプライマー)	50 µl	-20
unDNA negative control primer pair #2	各 10 µM (フォワード & リバースプライマー)	50 µl	-20

キットのモジュールとプロトコルの概要 (タイムテーブル)

DNA 調製 :

表 2a

モジュール		日程	所要時間
GenDNA モジュール			
1/	GenDNA ステップ 1. 培養細胞と溶解 GenDNA ステップ 2. 核酸の抽出と核酸精製 GenDNA ステップ 3. DNA 解析	1 日目 2 日目	40 分間 + オーバーナイト 数時間
2/	DNA 断片化	2 日目	20 分間

メチル化 DNA 免疫沈降 :

表 2b

モジュール		日程	所要時間
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 + オーバーナイト
	2. ビーズ洗浄	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 :

表 2c

モジュール		日程	所要時間
定量 PCR モジュール			
ステップ 3-	定量 PCR	2 日目*、3 日目**、 又は 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) のための DNA が準備される。
- IP (ステップ 1) は、5 時間、又はオーバーナイトのどちらでも行える。
- ステップ 2 で DNA が精製された方法によって、定量 PCR は早ければ 2 日目*、遅くても 3 日目**、又は 4 日目*** に実施される (*、**、***で示している DNA 精製の方法と定量 PCR の日程のリンクを参照)。

4. キットのアッセイプロトコール

Diagenode の METHYL KIT

メチル化 DNA 免疫沈降 (Methyl DNA IP) 用

スターティングマテリアル 培養細胞 又は 組織

各メチル化 DNA IP アッセイには 1 µg の DNA が必要である。それに合うようにスケールを調整する。

- ❖ GenDNAモジュールは、 $3 \sim 10 \times 10^6$ 細胞からゲノムDNAをバッチで 4 回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、スターティングマテリアルに合わせてスケールを調整する)。GenDNAモジュールの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)。
- ❖ 3×10^6 細胞から、20 ~ 30 µgのDNAが得られると思われる (下記表 3 参照)。
- ❖ 10^7 細胞から、50 ~ 100 µgのDNAが得られると思われる (GenDNAステップ 1-、参照)。
- ❖ 1 IP あたり 1 µg の DNA が必要とされることを忘れなければ、少ない細胞で始めることも可能である (表 3)。
- ❖ 使用するスターティングマテリアル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 IP 研究に用いることができる。ノーマル細胞 (健康な人) とガン細胞 (患者) 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 IP 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 IP 実験に使用するために断片化されるが、DNA と断片化 DNA の一部はダブルチェック用の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 IP の前: 1/ GenDNA ステップ 3: DNA 解析)
 - 2/ 断片化の効率チェック用 (メチル化 DNA IP の前: 2/ DNA 断片化 4.: 解析)
 - 3/ IP 実験の効率チェック用: インプットサンプル (メチル化 DNA IP ステップ 2- DNA 精製)

表 3

DNA 調製	必要な細胞数	DNA 量 (推定)	IP で使われる DNA
メチル化 DNA IP 1 回分	0.3×10^6	2.0 ~ 3.0 µg	1 µg
メチル化 DNA IP 10 回分	3×10^6	20 ~ 30 µg	10 µg (1 µg/IP)

メチル化DNA免疫沈降 (メチル化DNA IP) の前に:

はじめに DNA サンプルが調製され、下に示したように断片化される (1/ 及び 2/)。

1/ GenDNA モジュールを使ったメチル化 DNA IP のための DNA 調製

GenDNA ステップ 1: 培養細胞又は組織 (スターティングマテリアル) と細胞の溶解

GenDNA ステップ 2: 核酸抽出と DNA 精製

GenDNA ステップ 3: DNA 解析

2/ DNA 断片化プロトコールと Bioruptor を使った至適化

1/ メチル化 DNA 免疫沈降のための DNA 調製 (GenDNA モジュール)

第 1 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 の GenDNA モジュールは、培養細胞や哺乳類組織からゲノム DNA を調製するために至適化されており、調製したゲノム DNA はメチル化 DNA IP で使用される。

注意:

- 高分子量のゲノム DNA を “in house” 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 IP で使用することも可能であり、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 は精製され、最終的に TE に溶解される (詳細については Red ChIP Kit のマニュアルを参照)。

GenDNA モジュール: メチル化 DNA IP のためのゲノム DNA の調製

GenDNA ステップ 1:

- 培養細胞 (スターティングマテリアル) を使用する場合

1. 血清を含む培地の外に培養懸濁液を集める。接着細胞をトリプシン処理して、フラスコの細胞を回収し、遠心 (300 × g、5 分間、4 °C) する。

- ❖ $300 \times g$ (約 1,800 rpm ただし使用する遠心機による) 程度の低速を使用することをお奨めする。
 $\times g$ 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、 $500 \times g$ (2,300 rpm) よりも高速での使用を避け、穏やかな遠心を使用する。
2. 上清を捨て、細胞を 5~10 ml の氷冷した PBS に懸濁し、遠心 ($500 \times g$ 、5 分間) する。上清を捨て、もう一度氷冷した PBS に懸濁し遠心するステップを繰り返す。これが細胞洗浄ステップである。
- ❖ この間に、GenDNA Digestion buffer を室温 (RT) に、GenDNA proteinase K を氷上に置いておく (下記 3. で使用するため)。
3. 使用する前に、GenDNA proteinase K を GenDNA Digestion buffer に添加する。
- ❖ 供給される proteinase K のストックは $200 \times$ であるので、1 ml の Digestion buffer に $5 \mu l$ を添加する。
 - ❖ これが 4. で使用する完全な Digestion buffer である。
4. 細胞を完全な Digestion buffer (1 ボリューム) に懸濁する。
- ❖ 3×10^6 細胞には、 $300 \mu l$ の完全な Digestion buffer を使用する。
 - ❖ 10^7 細胞には、 $500 \mu l$ 完全な Digestion buffer を使用する。
 - ❖ 下記の 7. で抽出を行うときの問題を避けるためには、もっとバッファーを使用することが必要かも知れない。必要であれば、 3×10^6 細胞には $600 \mu l$ 、 10^7 細胞には $1,000 \mu l$ のバッファーを使用する。
 - ❖ 下記 5. に進む (細胞の溶解)。

- 組織をそのまま (スターティングマテリアル) 使用する場合

- 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 (例: 肝臓の胆嚢)。
 - ❖ $200 \text{ mg} \sim 1 \text{ g}$ でスタートし、冷たい乳鉢と乳棒ですりつぶす。
- 2B. 上記 3. で示したようにして、完全な Digestion buffer を準備し、組織粉末を完全な Digestion buffer に懸濁する。組織 100 mg に対して、1.2 ml の完全な Digestion buffer を使用する。
- ❖ 塊りになるのを避ける。
 - ❖ 使用するスターティングマテリアルにあわせて容量を調整する。
 - ❖ 下記 5. に進む (細胞の溶解)。

細胞の溶解

5. チューブの蓋をきつく閉め、振とうしながら 50°C で 12~18 時間サンプルをインキュベートする。これが細胞溶解ステップである。

- ❖ 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。

GenDNA 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 (25 : 24 : 1) 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) を加える。
 - ❖ 1 倍量は約 500 μ l である (上記 4. 参照)。
 - ❖ 遠心前に、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可能である。穏やかに回転させ、ボルテックスしない。
 - ❖ ドラフト内で作業する。
7. スウィングローターで遠心 (1,700 \times g、10 分間) する。
 - ❖ 微量遠心機では 4,700 rpm に相当する。
 - ❖ \times 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。
 - ❖ 高速で遠心しない。
 - ❖ ゲノム DNA であるので、超低速でなければいけない。
 - ❖ 上層 (水層) が適切にとれない場合は、Proteinase K を省いた GenDNA Digestion Buffer を追加添加し、遠心を繰り返す。
 - ❖ 上層 (水層) と下層 (有機層) の間に、白色の中間層が多い場合は、再抽出する (上記 4. 参照)。
8. 上層 (水層) 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 4. 参照)、ゆっくりとピペットでとる。
 - ❖ 次の操作に進む前に、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 9. ~ 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 の断片化を防ぐことができる。

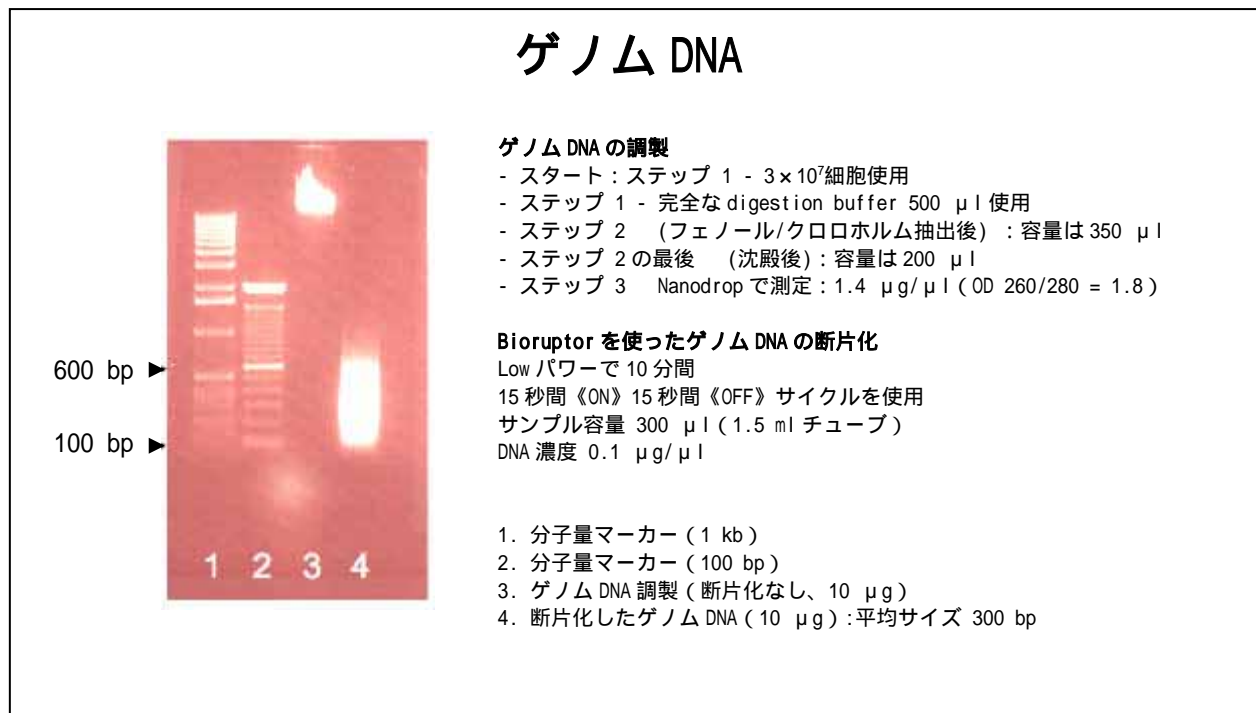
透析は、最低でも 100 倍量の TE (透析外液) に対して 2 回行い、DNA から有機溶媒と塩を除く。また、DNA は粘性が高いので、最低でも 24 時間の透析が必要である。

9. 1/2 倍量の 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 倍量は上層 (水層) の量である。
 - ❖ 1 倍量は約 500 μ l である (上記 4. 参照)。
 - ❖ 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. 遠心 (1,700 \times g、2 分間) し、DNA を回収する。
 - ❖ 高速で遠心しない。
 - ❖ ゲノム DNA であるので、超低速でなければいけない。
 - ❖ 高塩濃度沈殿剤 (GenDNA precipitant) 存在下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。
❖ 残存してい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 にサスペンドする。溶解を促進するために、室温又は 65 で数時間穏やかに振とうする。4 で保存する。
❖ 3×10^6 細胞から、20~30 μg (20~30 μl) の DNA が得られると思われる。
❖ 10^7 細胞から、50~100 μg (200~300 μl) の DNA が得られると思われる。
❖ できれば、(十分なマテリアルを使用できる場合は) 30 μg の DNA で作業できるように、少なくとも 30 μg の DNA を確保することを推奨する (2/ DNA 断片化プロトコール参照)。
13. 必要であれば、この段階で、DNA サンプル 1 ml あたり GenDNA RNase (DNase-free) を 2 μl 添加し、37 で 1 時間インキュベートして残存 RNA を取り除き、フェノール/クロロホルム抽出、及びエタノール沈殿を行う (上記 6. ~ 11. のように)。

GenDNA ステップ 3: DNA 解析

14. DNA 調製の効率を視覚化するために、サンプルを DNA サイズマーカーと一緒に 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される (レーン 4)。プロトコールと至適条件は、次ページの図の解説に記されている。



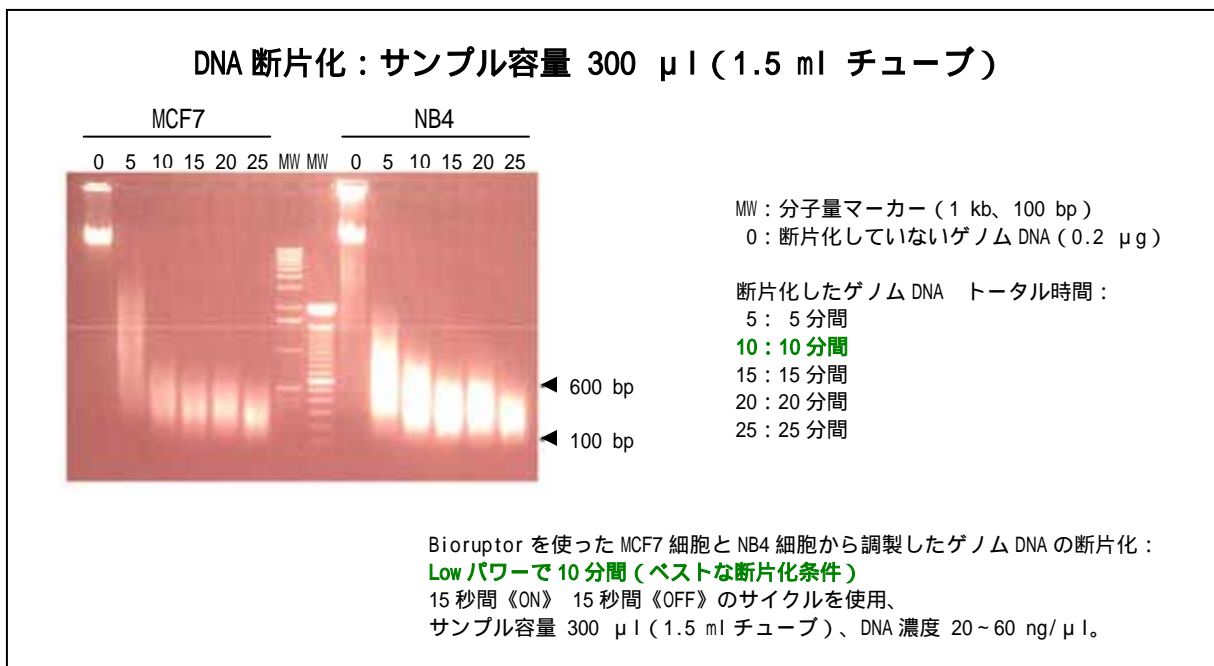
2/ DNA断片化プロトコールとBioruptor™を使った至適化

- 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 TE に溶かす。
 - ❖ メチル化 DNA IP 用の断片化 DNA サンプル調製の際には、DNA 濃度が 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になっていることを確かめる。
 - ❖ 1 IP あたり 1 μg の DNA が必要となることを覚えておく。
- 1.5 ml チューブに、最終容量 300 μl の DNA サンプルを入れて使用する。
 - ❖ (十分なマテリアルが使用できる場合は) 30 $\mu\text{g}/300 \mu\text{l}$ の DNA で作業することを推奨する。
 - ❖ 1 IP をサンプル 2 点とインプット (1 IP の 20% 相当) で行うためには、断片化 DNA サンプル 24 μl が必要となる (メチル DNA IP ステップ 1- パート 1 と表 5 参照)。
 - ❖ サンプルサイズと実施する IP の数にあわせて、スケールは調整する。
- Bioruptor™ を使って DNA を断片化する。 (<http://www.diagenode.com/>)
 - ❖ 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
- 前のページの図のように、断片化 DNA をアガロースゲルで解析する。

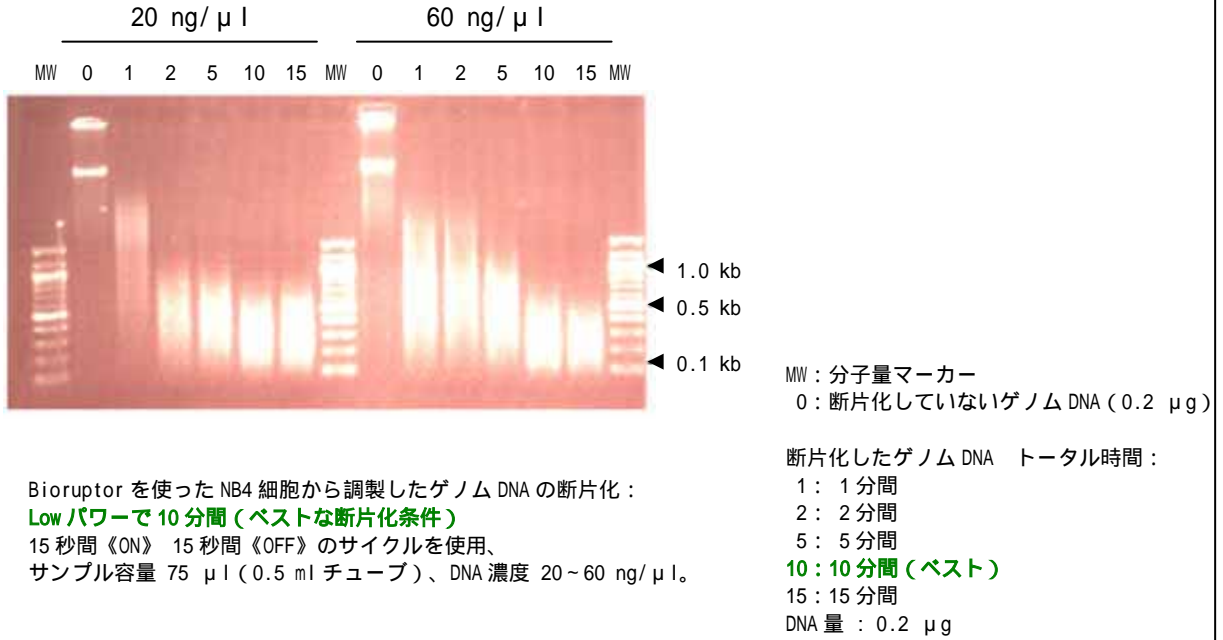
備考:

- 自分のサンプルの断片化条件を “in house” で至適化するために、実際に DNA を使って断片化する。“in house” 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 サイズは 300 ~ 500 bp である。

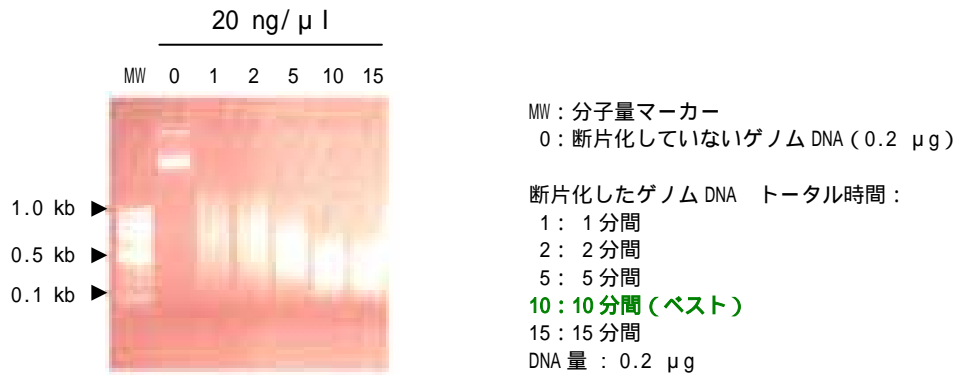
図: 断片化 DNA の解析と断片化条件の至適化



DNA 断片化 : サンプル容量 75 μ l (0.5 ml チューブ)



DNA 断片化 : サンプル容量 75 μ l (0.5 ml チューブ)



メチル化DNA 免疫沈降 (メチル化DNA IP)

下記ステップ1~3のように 各 DNA サンプルは IP され、解析される。

ステップ 1: メチル化DNAの免疫沈降と洗浄

ステップ 1, パート 1: IP 条件

ステップ 1, パート 2: 免疫沈降後の洗浄

ステップ 2: DNAの溶出と精製

ステップ 2, オプション 1: QIAquick PCR purification (QIAGEN) を使った溶出と精製

ステップ 2, 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

ステップ 3: 免疫沈降したDNAの定量PCR解析

ステップ 1: メチル化 DNA の免疫沈降と洗浄

ステップ 1, パート 1: IP 条件

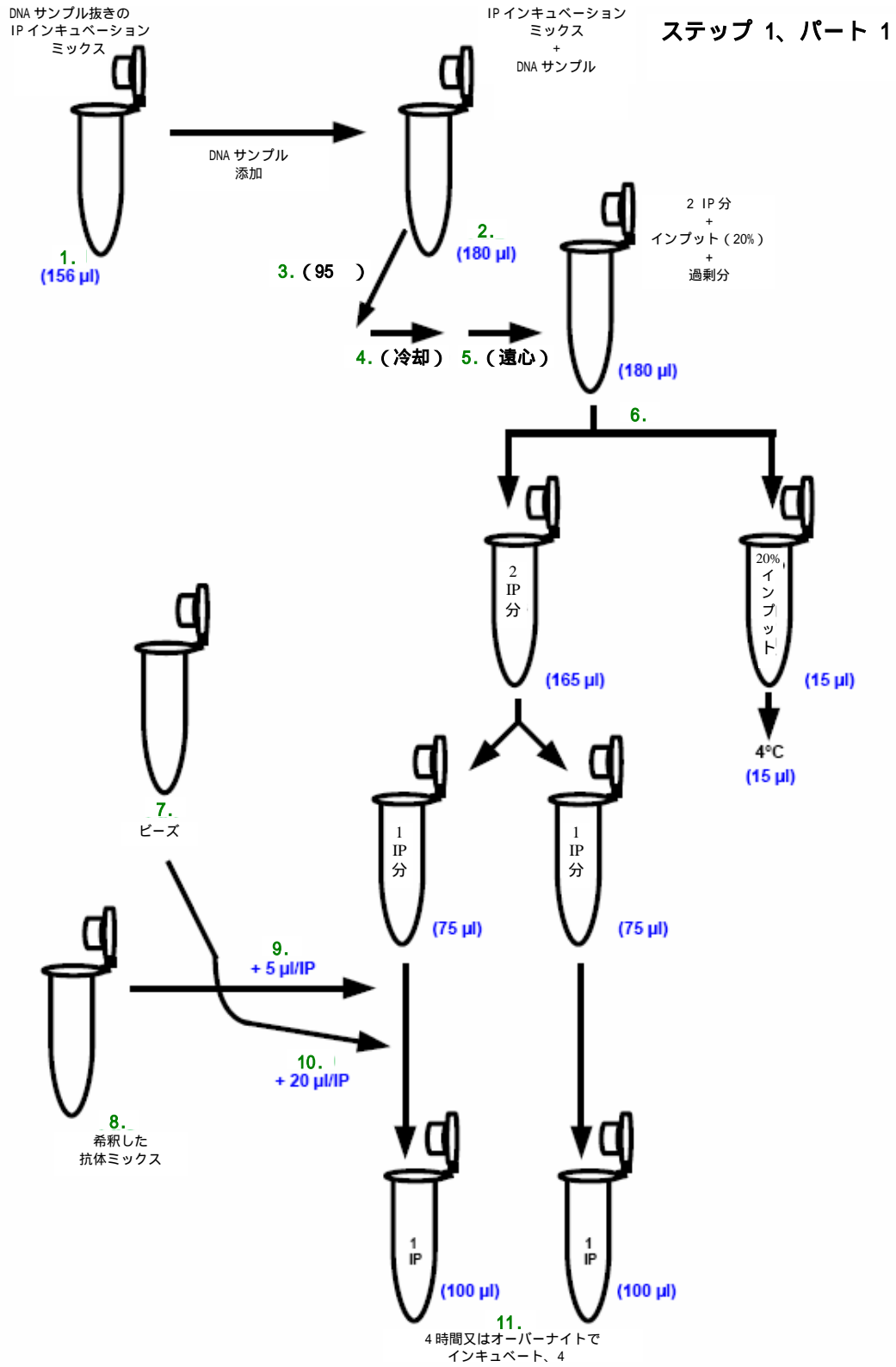
メチル化 DNA IP の概要:

下記の表 4 は、IP インキュベーションミックスに何が含まれているのかを示している。次ページのクイックチャートも参照。はじめに、試薬 #1~5 を含む IP インキュベーションミックスを調製する (下記 1. 及び表 5)。そして、DNA サンプルを添加する (2. 参照)。DNA ミックスを記載したとおりに処理する (3. ~6.)。最後に、試薬 #7 と 8 を加え (8. ~9.)、さらに試薬 #9 を加え (10.)、IP インキュベーションを開始する (11.)。

表 4. IP インキュベーションミックス成分概要

#	試薬	容量	コメント
1	Water (サンプルにあわせる*)	47.5 μ l DNA 容量 [1 μ g DNA]*	この場合: 37.50 μ l ** (=47.5-10)
2	Buffer A	20 μ l	
3	Buffer B	5 μ l	
4	Positive meDNA control	1.25 μ l	
5	Negative unDNA control	1.25 μ l	
6	1 μ g DNA sample	1 μ g	1 μ g/ 10 μ l ** (0.1 μ g/ μ l)
7	Antibody	3 μ l (1:10 希釈抗体)	希釈(1:10): 抗体 3 μ l/30 μ l 抗体 3 μ l + Buffer A 6 μ l + Water 21 μ l
8	Buffer C	2 μ l	
9	meDNA-IP blocked beads	20 μ l	
	トータル容量	100 μ l	

ステップ 1 パート 1 (1. ~ 11.) の Diagenode のメチル化 DNA IP クイックチャート



メチル化 DNA IP のプロトコール:

1. 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/ できれば最低 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 5 の右列を参照)。本キットには 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 5 の右列を参照)。
- ❖ インプットサンプルは、2 つの内部 IP コントロールを含む IP サンプルの 20% に相当する。
- ❖ 表 5 の右列は 2 IP と 20% のインプット分を調製する 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 20% の過剰分を含んでいる。)
- ❖ この段階で、IP インキュベーションミックスは、メチル化及び非メチル化 DNA 内部 IP コントロールを含んでおり、DNA サンプルは次のポイントで添加される。

表 5. 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 IP

#	試薬	1 IP あたりの容量	2 IP + インプット分を調製する場合の容量
1	Water (サンプルに合わせる*)	47.50 μ l DNA の容量 [1 μ g DNA] 37.50 μ l**	114 μ l DNA の容量 [2.40 μ g DNA] 90 μ l**
2	Buffer A	20.00 μ l	48 μ l
3	Buffer B	5.00 μ l	12 μ l
4	positive meDNA control	1.25 μ l	3 μ l
5	negative unDNA control	1.25 μ l	3 μ l
	トータル容量	65.00 μ l **	156.00 μ l

** : DNA を除いた IP インキュベーションミックスのトータル量は 65 μ l である。DNA サンプルの濃度が 0.1 μ g/ μ l の場合は、1 IP あたり 37.50 μ l の water 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 water の量を調整する。(1 IP あたりの容量が 65 μ l となるようにする。表 5 最終行。

2. 新しい 1.5 ml チューブにラベルし、DNA サンプル を IP インキュベーションミックスに入れる (下記参照)。

1 本のチューブ (*) に (2 点の IP とインプットを) 合わせて、又はそうしないで (**)、それぞれ始める。:

- ❖ (*) 各 IP を 2 点で行い、インプット DNA と 2 点の IP 用の DNA サンプルの両方を 1 本のチューブで混合するのがベストである (下記参照)。
- ❖ (**) 各 IP を 2 点で行うのに十分なサンプルがない場合は、代わりにセクションに進む (下記参照)。
- ❖ いずれの場合も : 1 IP あたり 1 μ g の DNA サンプルが必要とされる。

(*) 2点の IP とインプットを混合して始める場合:

2点の IP とインプットは 6. まで1本のチューブで混合される。

1本のチューブに入れる: IP インキュベーションミックスを入れた後、各チューブに 2.4 μg の DNA サンプルを添加する。

- ❖ 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の DNA サンプルを使用する場合、1チューブあたり 156 μl の 1. (表 5) で調製した IP インキュベーションミックスに、24 μl の DNA サンプルを加える。
- ❖ トータル容量は 180 μl で、2 IP 分 ($2 \times 75 \mu\text{l}$) と、20% インプット (15 μl)、20% の過剰分 (15 μl) に相当する。
- ❖ 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 以外の濃度の DNA サンプルを使う場合は、表 5 に記載したように容量を調整する。

(**) 個別のサンプルで始める場合:

○ IP インキュベーションミックスをそれぞれラベルされた “IP” チューブに入れ、各チューブに 1 μg の DNA サンプルを添加する。

- ❖ 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の DNA サンプルを使う場合、1チューブあたり 65 μl の IP インキュベーションミックスに、10 μl の DNA サンプルを加える。1 IP のトータル容量は 75 μl である。
- ❖ 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 以外の濃度の DNA サンプルを使う場合は、表 5 に記載したように容量を調整する。

○ “インプットサンプル” チューブに 上記 IP で使う分の 20%量を入れる。

- ❖ 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の DNA サンプルを使う場合、1チューブあたり 13 μl の IP インキュベーションミックスと、2 μl の DNA サンプルを加える。20%インプットのトータル容量は 15 μl である。
- ❖ 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 以外の濃度の DNA サンプルを使う場合は、IP で使う分の 20%量を入れる。

3. 95 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 で軽く遠心する。

6. (*) 1本のチューブに2点の IP とインプットが混合されている場合: はじめに 15 μl (20% インプット) をとり、ラベルした新しいチューブに移す。そして、残りを 75 μl ずつ 2本のラベルした IP チューブ (2 IP チューブ) に移す。

- ❖ 後のステップ 2 で使用するまで、インプットサンプルの温度は 4 に保つ。インプットサンプルはスターティングマテリアルのコントロールとして使用され、IP では使用されない。
- ❖ 下記 9. で 2本の IP チューブを使用する。

(**) 初めから個別のサンプルで作業している場合は、7. に進む。

7. 1IP ごとに新しい 1.5 ml チューブをラベルして用意する。1 IP あたり 20 μ l の meDNA-IP blocked beads (50%懸濁液) をすべてのラベルしたチューブに加え、下記 9. で使用するまで氷上に置く。

8. 新しいチューブに、下記表 6 で示したように希釈した抗体ミックスを調製する。

4 IP 分 (表 6 : 3 列目) と 10 IP 分 (表 6 : 4 列目) :

❖ 1:10 の希釈抗体を調製し (抗体、Buffer A、water)、その後で Buffer C を加える。

表 6 希釈した抗体ミックス

試薬 (#7 及び 8)	1 IP	4 IP 分の容量	10 IP 分の容量
Antibody anti-5meC (3x)	0.30 μ l	1.50 μ l	4.00 μ l
Buffer A	0.60 μ l	3.00 μ l	8.00 μ l
Water	2.10 μ l	10.50 μ l	28.00 μ l
Buffer C	2.00 μ l	10.00 μ l	27.00 μ l
トータル容量	5.00 μ l	25.00 μ l	67.00 μ l

❖ 上の表のトータル容量には過剰分が含まれている。

❖ その日に行う IP の数に合わせて、容量を調整する。

❖ 抗体の量が重要となるので、希釈ステップ (8.) は省略しない。

❖ 1 IP あたり 1:10 に希釈した抗体 3 μ l と 2 μ l の Buffer C が必要である (表 4)。

❖ 表 6 に示したように、抗体はまず Buffer A と water を使って希釈し、その後で Buffer C を添加する。

❖ そして、1 IP あたり 5 μ l の希釈した抗体ミックスを使用する (9.)。

9. 1 IP チューブあたり、5 μ l の希釈した抗体ミックスを加える (上記 6. から)。

❖ IP インキュベーションミックスと DNA サンプルを含む IP チューブに、抗体を添加する。

❖ そして、これをビーズを含むチューブに移す (10.)。

❖ 希釈した抗体の残りは廃棄する。

10. 混合した後、前もって準備しておいたビーズの入ったチューブ (上記 7.) に加える。

❖ これは表 4 に記載した IP インキュベーションミックスである。各チューブの最終容量は 100 μ l である。

❖ IP インキュベーションミックスには、IP サンプル、希釈した抗体ミックス、そしてビーズが含まれている。

11. ローテーターにセットし、4 で 4 時間又はオーバーナイトでインキュベートする。

ステップ 1, パート 2: 免疫沈降後の洗浄

12. メチル化 DNA IP サンプルは次のように洗浄される。 : 各チューブに 450 μ l の氷冷した Wash buffer を加える。Wash buffer-1 で洗浄を開始する。
 - ❖ 4 つの Wash Buffer を氷上に置き、洗浄は低温室で行う。
13. 4 で 5 分間回転させる。
14. 遠心 (6,000 rpm、1 分間、4) する。
15. 沈殿を乱さないように、上清を捨て、沈殿を残す。
16. (上の 12. ~ 15. で記載したように) 沈殿を次の順で洗浄する。 : Wash buffer-1 でもう 1 回、Wash buffer-2 で 1 回、Wash buffer-3 で 1 回、そして最後に Wash buffer-4 で 2 回洗浄する。
17. 最後の洗浄の後は、(P200 のピペットを使って) Wash buffer を完全に取り除く。ビーズのペレットを残し、ステップ 2- へ進む。
 - ❖ これがメチル化 DNA IP サンプルである。
 - ❖ 免疫沈降したメチル化 DNA がビーズに結合している。

ステップ 2: DNA の溶出と精製

ステップ 2, オプション 1: QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN # 28104 又は #28106)を使った溶出と精製

1. インプットサンプルをとり、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。
 - ❖ インプットサンプル (ステップ 1-6.)
 - ❖ メチル化 DNA IP サンプル (ステップ 1- 17.)
2. Buffer D、E、F を次のように混ぜて、完全溶出バッファーを調製する。
 - ❖ 右列は 2 IP 分と 20% インプット用の完全溶出バッファーの量である。(最終容量は 10%の過剰分を含む。)

表 7 完全溶出バッファー

完全溶出バッファー	1 メチル化 DNA IP	2 IP 分 + 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	388.00 μ l

3. 120 μ l のフレッシュな完全溶出バッファーをビーズの沈殿に加える (メチル化 DNA IP サンプル)。
4. 120 μ l のフレッシュな完全溶出バッファーをインプットサンプルに加える。
5. 1,000 ~ 1,300 rpm、65 °C で 10 分間、サーモシェーカーでインキュベートする。
6. 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、サンプルをカラムにアプライし、遠心 (4,000 rpm、1 分間) する (できれば 1 本のカラムに 2 点分のメチル化 DNA IP サンプルを結合させる)。
7. 700 μ l の PE で洗浄し、遠心 (4,000 rpm、1 分間) し、フロースルーを捨てる。
8. 遠心 (13,000 rpm で 1 分間) する。
9. カラムを新しいチューブにセットし、50 μ l の TE で溶出する。
 - ❖ TE バッファーが pH 8.00 であることを確認する。pH が低い場合、収量が低下する。
10. 50 °C で 5 分間インキュベートする。
11. 遠心 (13,000 rpm、1 分間) 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) と、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 3- に進む。

ステップ 2, 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

I. インプットサンプルをとり、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。

- ❖ インプットサンプル (ステップ 1-6.)
- ❖ IP サンプル (ステップ 1-17.)

II. Buffer D、E、F を次のように混ぜて、完全溶出バッファーを調製する。

- ❖ 右列は 2 IP 分と 20% インプット用の完全な溶出バッファーの量である。(最終容量は 10% の過剰分を含む。)

表 8 完全溶出バッファー

完全溶出バッファー	1 メチル化 DNA IP	2 IP 分 + インプット
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 μl	1,373 μl

III. 416 μ l のフレッシュな完全溶出バッファーをビーズの沈殿に加える (メチル化 DNA IP サンプル)。

IV. 416 μ l のフレッシュな完全溶出バッファーをインプットサンプルに加える。

V. 1,000 ~ 1,300 rpm、65 °C で 10 分間、サーモシェーカーでインキュベートする。

VI. 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。

VII. 遠心 (2 分間、14,000 $\times g$ (13,000 rpm)、室温) し、上層 (水層) を新しい 1.5 ml チューブに移す。

VIII. 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、DNA co-precipitant を氷上で溶かす。

IX. 遠心 (2 分間、 $14,000 \times g$ (13,000 rpm)、室温) し、上層 (水層) を新しい 1.5 ml チューブに移す。

X. 1 チューブあたり : 5 μ l の 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。

XI. 遠心 (25 分間、 $14,000 \times g$ (13,000 rpm)、4) し、上清を慎重に除き、500 μ l の氷冷した 70% エタノールを沈殿に加える。

XII. 遠心 (10 分間、 $14,000 \times g$ (13,000 rpm)、4) し、上清を慎重に除き、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 分放置する。沈殿は : 1/ 断片化した DNA から精製した DNA (インプットサンプル) と、2/ IP で分離された DNA (メチル化 DNA IP サンプル)。

エタノールがチューブ壁に残らないようにする。

インプットサンプルとして使用している断片化 DNA は、IP アッセイで使用された断片化 DNA と同時に調製したものに相当しなければならない。

XIII. 50 μ l の TE を IP とインプットサンプルに加える。

DNA を均一にサスペンドする。 : 沈殿を溶かすために、12,000 rpm で、30 分間、室温の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) と、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 3- に進む。

ステップ 3: 免疫沈降した DNA の定量 PCR 解析

定量 PCR モジュールには 4 つのタイプの DNA で検証されたプライマーペアが含まれる。:

- a: メチル化ヒト DNA 領域 (X-linked alpha satellites)
- b: 非メチル化ヒト DNA 領域 (GAPDH promoter)
- c: メチル化 DNA コントロール (meDNA positive ctrls #1 及び #2)
- d: 非メチル化 DNA コントロール (unDNA negative ctrls #1 及び #2)

METHYL 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 IP した DNA の増幅の予想。左列の色分けは結果の項のグラフの色分けに対応している。

表 8 メチル化 DNA IP の後で使用する定量 PCR モジュール

	プライマーペア (10 µM each)	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 (AlphaX1)	ヒト DNA	Yes (サンプルがヒト DNA の場合)	Yes
	hum unDNA primer pair (GAPDH)	ヒト DNA	Yes (サンプルがヒト DNA の場合)	No
	meDNA pos control primer pair #1	キットのポジティブ コントロール	Yes	Yes
	meDNA pos control primer pair #2	キットのポジティブ コントロール	Yes	Yes
	unDNA neg control primer pair #1	キットのネガティブ コントロール	Yes	No
	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。:

- メチル化 DNA IP 及びインプットから精製した DNA を使用する (ステップ 2- の最後)。
- 50 µl の精製 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 解析用に、**精製 DNA サンプル各 10 µl** を次のように希釈する。:
10 µl の精製 DNA サンプルに 35 µl の water を加えて、45 µl とし、PCR 1 反応あたり 5 µl を使用する (下記参照)。

注意: meDNA primer pair (AlphaX1) でテストする際は、DNA サンプルを 1:1,000 に希釈する。

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 µl/反応):

提供されたプライマーペア (ストック: 各 10 µM: フォワード及びリバース) 1.00 µl
 マスターミックス (例: iQ SYBR Green supermix) 12.50 µl
 希釈した精製 DNA サンプル (DNA の希釈については上記参照) 5.00 µl
 water 6.50 µl

定量 PCR サイクル:

	温度	時間	サイクル
PCR 増幅	95	7 分間	x 1
	95	15 秒間	x 40
	60	60 秒間	
	95	1 分間	x 1
融解曲線	65 で 1 サイクルにつき 0.5 ずつ上昇	1 分間	x 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 (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 ~ 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⁾。 : $AE = 10^{-1 / \Delta Ct}$
- _ 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 のデータから計算することができる。 :

% (メチル化 DNA IP / トータルインプット)

$$\% (\text{メチル化DNA IP} / \text{トータルインプット}) = 2^{-(Ct(20\% \text{input}) - 2.322) - Ct(\text{MeDNA IP})} \times 100\%$$

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 (20% 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 (2.322) はインプットの 1:5 希釈を考慮するために使われる。; **recovery** は%(メチル化 DNA IP / トータルインプット)である。

❖ **バックグラウンドの決定**

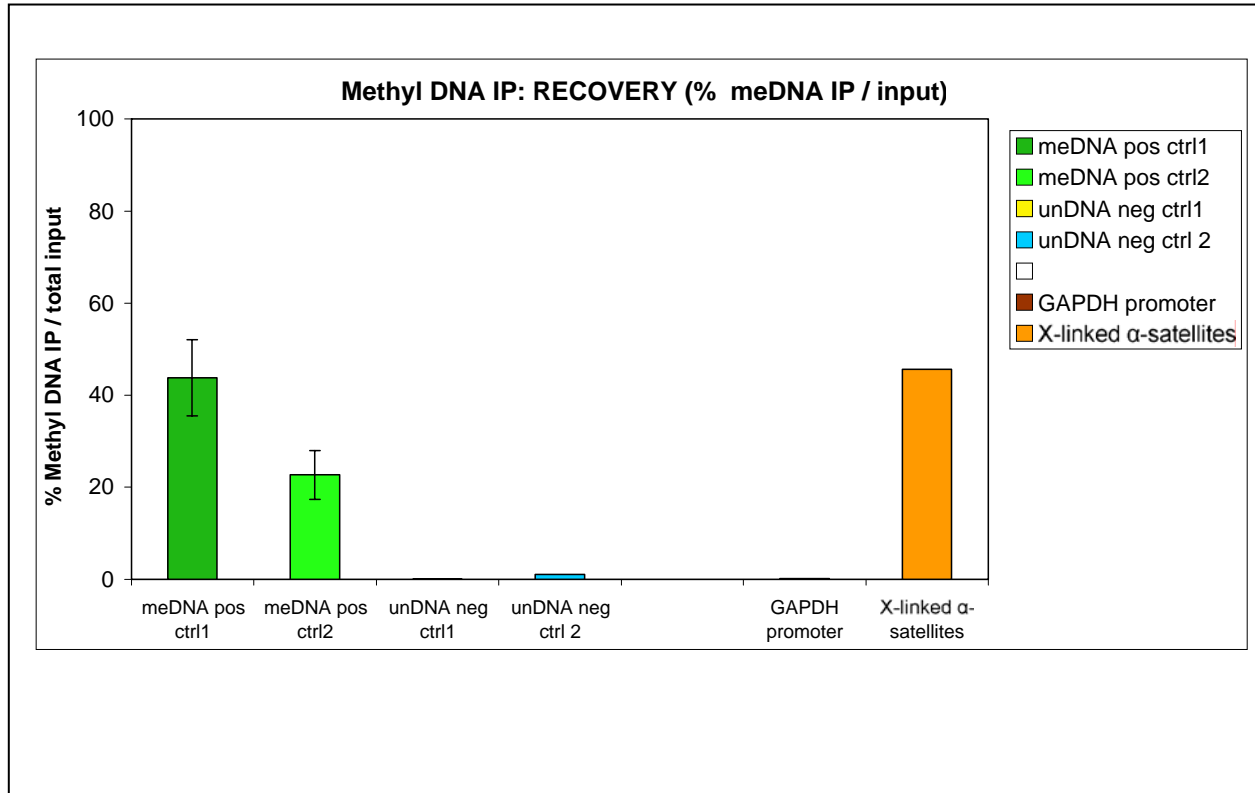
IP の最終目的は同じ IP サンプル中で、非メチル化 DNA (ネガティブ unDNA コントロール) と比較して特異的な DNA 断片 (メチル化 DNA に相当する) がどれほど多いかを算定することである。

❖ **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 及び 2) で得られるシグナルに相当する。

METHYL KIT の結果



DiagenodeのMETHYL Kitを使ったメチル化DNA IPの結果

細胞：NB4細胞

抗体：antibody directed against 5-methyl Cytidine (Diagenode)

PCRプライマー：定量PCR用に至適化されたプライマーペア

DNA調製：GenDNAモジュール

IP：キットの内部コントロール、ヒトDNAサンプル

IPアッセイの内部ポジティブ及びネガティブDNAコントロール：メチル化DNA (meDNA) 及び非メチル化DNA (unDNA)

DNAは免疫沈降されたマテリアルから精製され、キットに含まれるプライマーペアを使ったPCRで解析される（下記参照）。

各“プライマーペア”は特定のDNAをターゲットとし、次のような結果が期待される。：

- 内部DNAコントロール

“meDNA pos ctrl1”：メチル化DNAコントロール（メチル化のポジティブシグナルが得られる。）

“meDNA pos ctrl2”：メチル化DNAコントロール（メチル化のポジティブシグナルが得られる。）

“unDNA neg ctrl1”：非メチル化DNAコントロール（メチル化0%のためシグナルは得られない。）

“unDNA neg ctrl2”：非メチル化DNAコントロール（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。

“X-linked alpha-satellites”：メチル化された領域でポジティブシグナルが期待される。

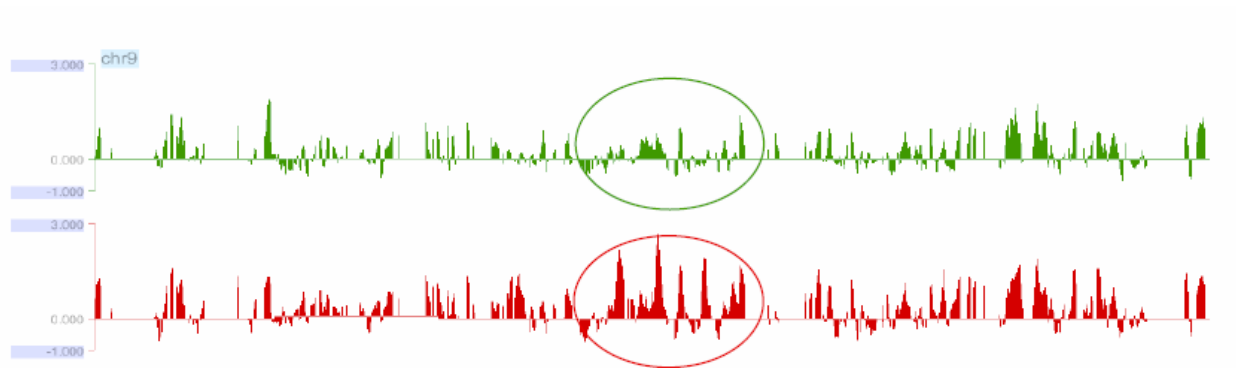
メチル化DNA IPコントロールはIP効率を示している。

5. 追記プロトコール

メチル化 DNA IP-on-chip

メチル化 DNA IP 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 らによって詳細が述べられている T7 をもとにしたリニア増幅法である (2)。

結果



Diagenode の METHYL Kitを使ったメチル化DNA IP-on-chip

増幅とハイブリダイゼーションの前に、DiagenodeのMETHYL Kitでメチル化DNA IPが行われた。

2つのサンプルのDNAメチル化解析：(上)健康な人、(下)患者

アレイのピーク：第9染色体の遺伝子及びその周辺のメチル化DNA領域

健康な人(上)と比較して、患者(下)のサンプルではメチル化DNAが明らかに多い(上図の丸で囲ったところ)。

6. 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が使われなければならない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	キットで供給され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、低品質な写真になる。	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 を以上ロードしない。 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に対し、抗体不足は IP 効率低下の原因となる。
PCR	自分のプライマー	- 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 (キットのコントロール及びヒト) に特異的なプライマーを使った PCR ポジティブ PCR コントロール: メチル化された DNA 領域 (キットのコントロール及びヒト) に特異的なプライマーを使った PCR 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	提供された PCR プライマーは、コントロール DNA 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 の効率の迅速なチェックのために供給される。	
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。	瞬間凍結し、氷上で溶かす。

7. 参考資料

1. Pfaffl M.W. 2001 *Nucleic Acids Res.* 29(9):e45.
2. Liu C.L., Schreiber S.L. and Bernstein B.E. 2003 *BMC Genomics* 4(1):1-11.

8. 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
TEL: +32 (0) 4 364 20 50 FAX: +32 (0) 4 364 20 51
E-mail: info@diagenode.com

Diagenode Inc. USA

376 Lafayette Road, Suite 202
Sparta, NJ 07871
TEL: +1 973 300 0976 FAX: +1 973 300 1862
E-mail: infousa@diagenode.com

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