

クロマチン免疫沈降キット OneDay ChIP Kit™

NIPPON GENE Code No. 313-80461
(Diagenode Catalog #: kch-oneDIP-060, kch-oneDIP-180)

Instruction Manual (version 1) (日本語訳 1.01版)

このマニュアルは、Diagenode 社の OneDay 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いわないでください。

株式会社ニッポンジーン

目次

1. はじめに	p 3
2. キットの概要	p 4
3. キットの構成	p 5
キット内容	p 5
本品以外に必要な試薬・消耗品・装置	p 5
プロトコールの概要とタイムテーブル	p 7
4. キットのアッセイプロトコール	p 8
スターティングマテリアル 断片化したクロマチン	p 8
ステップ 1 : 免疫セレクション	p 10
ステップ 2 : 免疫沈降	p 13
ステップ 3 : DNA精製	p 15
ステップ 4 : 定量PCRとデータ解析	p 17
定量PCR	p 17
データ解析	p 18
OneDay ChIP Kitを使った実験例	p 20
5. トラブルシューティングガイド	p 25
追加プロトコール：クロマチン断片化の方法	p 30
6. 参考資料	p 32
7. お問い合わせ	p 32

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等、生きている細胞の多くの機能を決定しています。したがって、DNA結合タンパク質のターゲット遺伝子と、遺伝子調節パスウェイや細胞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が重要です。

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、転写調節因子のリクルート等を決定するために使われています(1)。そしてこの技術は、細胞の固定、クロマチンの断片化、免疫セレクション、免疫沈降、そして免疫沈降したDNAの解析の工程から成っています。

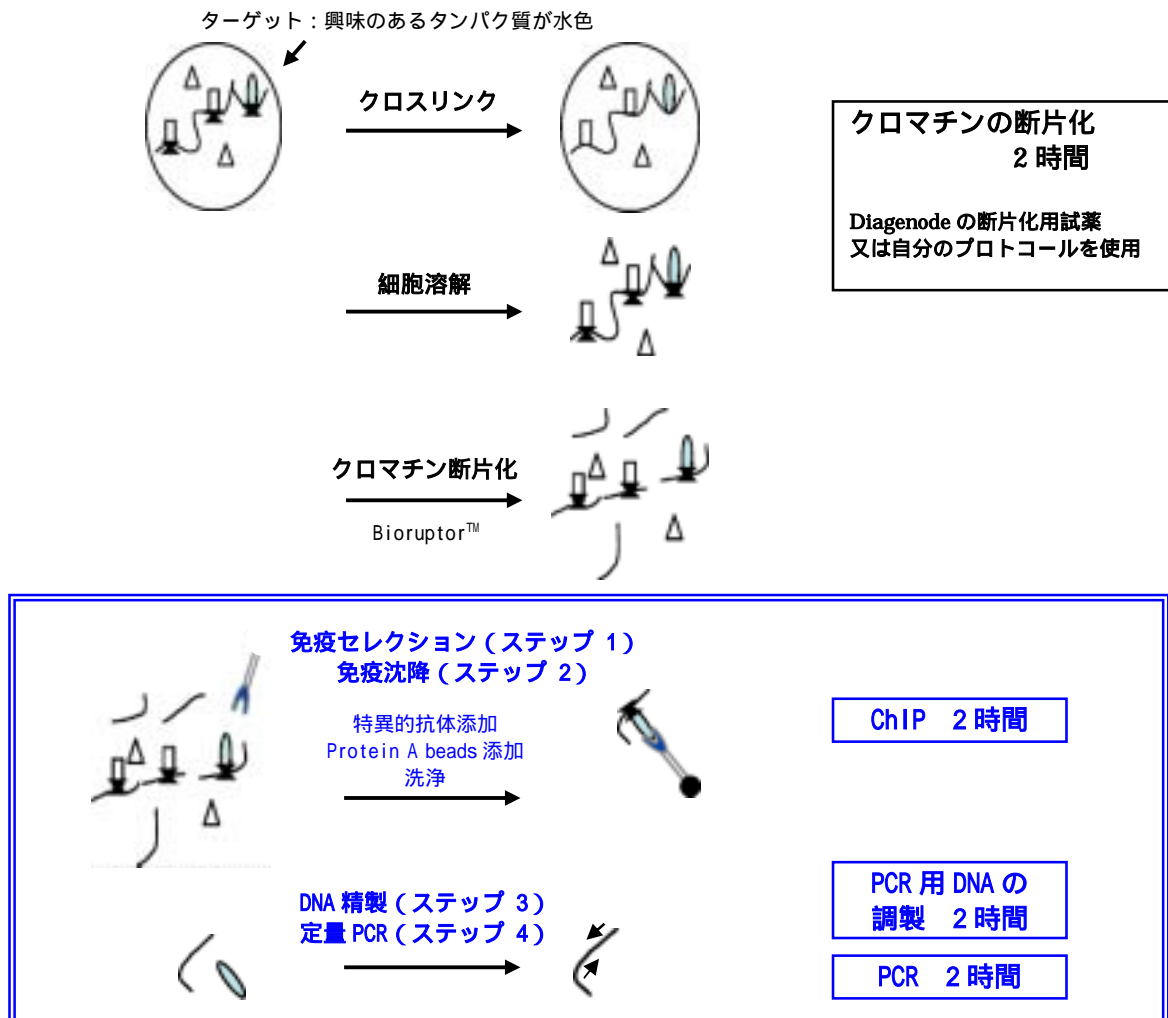
はじめに、細胞はクロスリンク試薬により短時間で可逆的に固定されます。次に、クロスリンクされたクロマチン(DNAとタンパク質)が断片化され、興味のあるタンパク質と結合したDNA断片が特異的な抗体で免疫沈降(IP)されます。最後に、免疫沈降されたDNAは、定量ポリメラーゼ連鎖反応(定量PCR)によって、特定の配列の存在を試験されます。その沈降の中に特異的な配列がたくさん(多量に)あるということは、興味のあるタンパク質がそのDNA領域と *in vivo* で結合していることを示しています。

生きている細胞において、DNA-タンパク質インターアクションを固定する手法として最も広く使われているのは、タンパク質のアミノ基またはイミノ基と核酸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、DNA-タンパク質のクロスリンクと同じように、タンパク質-タンパク質複合体も *in situ* でクロスリンクします。そして、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する必要があります。そして、DiagenodeのBioruptor™を使用することで、ChIP用の高品質なクロマチン断片を調製することができます。さらに、Diagenodeのクロマチン断片化用試薬を利用することで、再現性の高い断片化が簡単に行えます。そして、Antibody binding beads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とされます。最終的には、特異的な免疫沈降による特定DNA断片の相対的な量が、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はとても用途の広い解析手段ですが、その工程はめんどろな反応条件の至適化をいくつか必要としています。Diagenodeでは、ChIP用に至適化された試薬と、シンプルなプロトコールのキットを提供しています。従来法のChIPでは、2つのオーバーナイト インキュベーション(抗体とターゲットの結合、免疫沈降したDNAの精製)を含んでいるため時間がかかるということが問題でしたが、Diagenodeでは、従来法のChIPキット(Red ChIP KitとOrange ChIP Kit)だけでなく、迅速法のChIPキット(OneDay ChIP Kit)も提供しています。

OneDay ChIPメソッドでは、ChIP工程の有用性を向上するためにプロトコールが改良され、1日あたり、1週間あたり、より多くのChIPを行えるようになりました。2つのオーバーナイト インキュベーションがなくなったことで、すべての作業を1日で行うことができます。1) 抗体の結合は超音波ウォーターバスでの抗体とクロマチンのインキュベートにより加速され、2) DNA purifying slurryを使用することでDNA精製のステップが簡単になり(キットの概要参照)、従来法に比べて、これらの2つのステップが格段に短縮されました。キットには、60 IP用と180 IP用の2つのキット形態があります。(180回用の購入については、別途お問い合わせください。)

2. キットの概要



Diagenode の OneDay ChIP Kitは、免疫セレクションと免疫沈降を2時間で、PCR用のDNAを2時間で調製できます。

OneDay ChIP Kit には、ユーザーフレンドリーなプロトコールだけでなく、すべて工程に至適化された試薬とバッファーが含まれています。60 ChIP解析用と180 ChIP解析用の2つのキット形態が購入できます。(180 ChIP用の購入についてはお問い合わせください。)

- A. Diagenodeのクロマチン断片化用試薬とBioruptor™を使ってChIP用の断片化クロマチンを準備してください。
- B. 断片化したクロマチンとChIPグレート抗体を持っているのであれば、シンプルで、迅速で、至適化された、この新しいOneDay ChIP Kitを使用してください。ChIPを行うために必要な日数は、DiagenodeのOneDay ChIP Kitを使うことで、従来の3日から1日に短縮されます(7ページ参照)。

上図の説明：タンパク質を長方形、三角形、卵形で示しており、興味のあるタンパク質が水色です。DNA(黒線)と結合しているタンパク質とそうでないものがあり、クロスリンクされたタンパク質とDNAは太十字で示しています。

超音波(Bioruptor™)で切断することによりクロマチンを断片化し、断片化したクロマチンと抗体をインキュベート(ステップ1)、その後、Antibody binding beadsで免疫沈降します(ステップ2)。そして、免疫沈降したDNA断片を精製し(ステップ3)、PCRで増幅します(ステップ4)。

3. キットの構成

キット内容

本品には、免疫セレクション、免疫沈降から、PCR用DNA^{*}の調製まで、ChIP解析60回分（又は180回分^{**}）の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。

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。

表1（備考：製品到着後、試薬はそれぞれ正しい温度で保存してください。）

OneDay ChIP（ステップ 1~4）			
内容	コメント	容量	保存
ChIP buffer 5×	塩、界面活性剤、イオンキレート剤ミックスが含まれます。	300 ml (700 ml ^{**})	室温
Protease Inhibitor mix (P.I. 200×)	200×のストック溶液です。	100 μl (300 μl ^{**})	-20
Antibody binding beads	1:4 懸濁液です。	2,800 μl (8,000 μl ^{**})	4
Negative Ctrl IgG from rabbit	0.02%のアジ化物が含まれます。	100 μl (250 μl ^{**})	4
Blocker for ChIP-Ab binding beads	100×のストック溶液です。	200 μl (500 μl ^{**})	-20
DNA purifying slurry	-	10 ml (25 ml ^{**})	4
Proteinase K	100×のストック溶液です。	100 μl (250 μl ^{**})	-20
PCR-grade H ₂ O	-	28 ml (85 ml ^{**})	4

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）
- ・RNase/DNase freeの1.5 mlチューブ
- ・その他のチューブ：PCRチューブ又はプレート、15 mlチューブ
- ・オートクレーブ滅菌済みのピペットチップ、フィルターチップ
(・先をカットしたピペットチップ (Antibody binding beads の懸濁液に使用))
- ・チューブクラップ
- ・脱イオン水
- ・100%エタノール
- ・75%エタノール (vol/vol)
- ・アガロース及びTAEバッファー
- ・定量PCR（又はエンドポイントPCR）用試薬

装置

- ・アスピレーター
- ・1.5 mlチューブ用冷却遠心機 (4)
- ・15 mlチューブ用冷却遠心機 (4)
- ・超音波ウォーターバス (卓上型超音波洗浄器)
*** (B3510-MT http://www.bransoninc.com/model_3510.asp CPN-952-316)
- ・ローテーター (4)
- ・サーモミキサー又は振とうヒートブロック (55)
- ・沸とう浴 (98 ~100)
- ・定量PCR (又はエンドポイントPCR) 装置と試薬
- ・アガロースゲル電気泳動装置一式

重要事項：

- *: 本キットには、(クロスリンク~PCRまでの)完全なトラブルシューティングガイド (“TsG”)とプロトコールは含まれておりますが、クロマチンの断片化、及びPCRに必要な試薬は含まれておりません。
ChIP用断片化クロマチンの調製には、Diagenodeのクロマチン断片化用試薬とBioruptor™を使用します。「in house」プロトコールを使用することもできます(追加プロトコール参照)。
- ** : 60回用と180回用の2つの包装形態があります。(180回用については別途お問い合わせください。)
- *** : 洗浄用の超音波洗浄器 (115/120 V、50/60 Hz)として売られています(4)。
もし、超音波ウォーターバスが使用できない場合は、ステップ 1で長時間インキュベートしてください。トラブルシューティングガイド (“TsG”)参照。

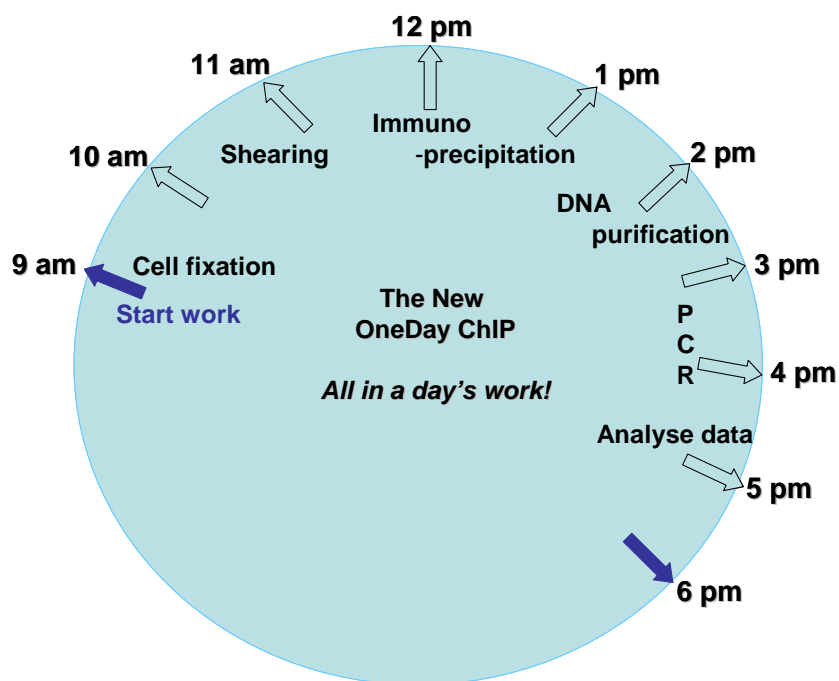
OneDay ChIP : プロトコールの概要とタイムテーブル

表2

クロマチン断片化ステップ	所要時間
Diagenodeのクロマチン断片化用試薬を使用	
細胞の固定と回収	1時間
細胞溶解	30分間
クロマチン断片化	30分間

表3

OneDay ChIP Kitの操作ステップ		日	所要時間	4時間
ステップ 1	バッファの準備...	1日目	10分間	
	免疫セレクション	1日目	30分間	
	遠心	1日目	10分間	
ステップ 2	免疫沈降	1日目	30分間	
	洗浄	1日目	50分間	
ステップ 3	DNA精製	1日目	2時間	
ステップ 4	定量PCRとデータ解析	1日目	2時間	



4. キットのアッセイプロトコール

OneDay ChIP : クロマチン免疫沈降の手順

スターティングマテリアル - 断片化したクロマチン

OneDay ChIP Kitのプロトコール(次ページで開始)で使用するため、断片化したクロマチンを準備する。自分のプロトコールで断片化したクロマチンを準備する。

Diagenodeのクロマチン断片化用試薬を使用することを推奨する。: 下記でプロトコールの概要とクロマチン断片化のメインステップを確認する。自分のプロトコールで断片化クロマチンを調製することもできる(“追加プロトコール”参照)。トラブルシューティングガイド(“TsG”)も参照する。

重要:

各 ChIP は $1.5 \sim 2 \times 10^6$ 細胞の断片化クロマチンを必要とする。スケールは適当に調整する。

Diagenode の Red ChIP Kit の断片化モジュールで : ChIP 用の断片化クロマチンを調製し、従来法の Red ChIP、又は迅速法の OneDay ChIP で ChIP を行う。

(Shearing ChIP Kit を使用する場合はプロトコールについては、p 31 を参照。)

OneDay ChIP で使用する断片化クロマチンを調製する断片化モジュールは Diagenode から入手できる。断片化モジュールは、簡単で再現性の高いクロマチン断片化法を提供する。そして、OneDay ChIP Kit を使った迅速 ChIP 法で ChIP を行う。2つのスタンダードプロトコールとキットを使用することで、断片化から ChIP までの工程で発生する実験間の誤差を少なくすることができる。

高品質の断片化クロマチンを得ることは、その後のクロマチン免疫沈降(ChIP)アッセイの成功のために必要である。クロスリンクしたクロマチン(タンパク質とDNA)を断片化するために要求される至的条件の確立は常に面倒であるが、断片化モジュールのプロトコールは最高の結果を得るために至適化されている。

培養している細胞がコンフルエントに達したら、断片化モジュールのプロトコールのステップ 1 (プロトコールと試薬は Red ChIP Kit のマニュアルと同様)をスタートする。インダクションや処理をした細胞を使用することもできる。これらの細胞は処理していない細胞と同様に調製し、ChIP で研究に使用される。細胞はスクレーピングの前(ステップ 1-a) 又は回収後(ステップ 1-b)に固定される。両方の方法が Red ChIP Kit のマニュアルに記載されている。自分の ChIP のターゲットに最適な方法を使用する。

断片化クロマチンを調製するため、Red ChIP Kit の断片化モジュールに入っている至適なバッファーを使用する。Red ChIP Kit の断片化モジュールには、 10^8 細胞のクロマチンを断片化できるバッファーが入っており、50~60 IP で使用される。一度に 5×10^7 細胞を断片化することができる。さらに多量の細胞で行う場合は、スケールを調整する。断片化クロマチンは、後の OneDay ChIP プロトコールで、1 免疫沈降(IP)あたり 45~60 μ l の断片化クロマチンが使用するよう調製する(表 4)。

追記事項:

各 ChIP アッセイは $1.5 \sim 2 \times 10^6$ 細胞を必要とする。スケールは調整する。

コンフルエントまで増殖した HeLa 細胞の場合、175 cm² 培養フラスコあたり約 3 × 10⁷ 細胞となり、20 IP に十分な量である。

サンプル数は、細胞のタイプの数と、テストされるコンディションの数に依存する。インダクションや処理をした細胞を使用することもできる。これらの細胞は処理していない細胞と同様に調製でき、ChIP で研究される。

サンプルサイズは、1 サンプルあたりテストされる ChIP の数に依存する。1 サンプルは最小で 3 × 10⁶ 細胞、最大で 5 × 10⁷ 細胞からなる (Red ChIP Kit マニュアル参照)。サンプルが大きい場合は、スケールを調整する。

IP の数：1 IP あたり、2 × 10⁶ 細胞が必要である。すなわち、5 × 10⁷ 細胞で、最大で 25 IP が実施できる (表 4)。

表 4

Red ChIP kit : 断片化モジュール (ステップ 1~3)		
ステップと使用するバッファー	量	コメント
スターティングマテリアル: 10 ⁸ 細胞	-	5 × 10 ⁷ 細胞ずつ 2 サンプルで行う。
細胞の回収: Buffer A	10 ml	使用容量はステップに依存する。: ステップ 1-a 又は b
1.25 M glycine	10 ml	
溶解 1: Buffer B	30 ml	
溶解 2: Buffer C	30 ml	5 × 10 ⁷ 細胞 / 15 ml
クロマチン断片化: Buffer D	3 ml	5 × 10 ⁷ 細胞 / 1.5 ml
実施できる OneDay ChIP の数	50 IP (最大)	1 OneDay ChIP あたり 60 μl の断片化クロマチン使用 (2 × 10 ⁶ 細胞相当)
	60 IP (最大)	1 OneDay ChIP あたり 45 μl の断片化クロマチン使用 (1.5 × 10 ⁶ 細胞相当)

至適化されたユーザーフレンドリーな Diagenode の断片化用試薬と Bioruptor の使用が ChIP 成功の鍵である。断片化の後で、クロマチンは OneDay ChIP で使用できるようになる。

クロマチン IP 標準化のための Diagenode の OneDay パッケージには、Bioruptor、クロマチン断片化用試薬、OneDay ChIP Kit が含まれる。

クロマチン IP 結果の再現性を確実にする。 : Diagenode の OneDay パッケージを使う !

初めに、ChIP 用の高品質な断片化クロマチンを調製し、迅速 ChIP 法で ChIP を行う。: 1/標準化されたプロトコルを使う。2/至適化された試薬で行う。その結果、断片化から ChIP までに発生する潜在的な変動を減少させ、それは実験から実験へのデータ解析を大いにやりやすくするのに必須である。

時間の節約: 細胞の回収から ChIP データの解析まで、ChIP 解析の全工程が 1 日で終了。

Diagenode 製品はポジティブコントロールとネガティブコントロールで検証される。(抗体及び PCR プライマーは Diagenode から入手できる。)

OneDay ChIP Kit プロトコール

ステップ 1: 免疫セレクション

この最初のステップは、断片化したクロマチンに抗体を添加することから成っている。

免疫セレクションのインキュベーションの間に、次の免疫沈降のステップで使用するため Antibody binding beads の洗浄を行う。

-
- ChIP解析を始める前に、どの断片化したクロマチンサンプルと、どの抗体と、コントロールを使用するかを決める。(#1 ~ #20とラベルした1.5 mlチューブを使って、並行して20 ChIPを行う。)
 - 下記のプロトコールは同じ日に並行して20 IPを行うためのものである。 それ以上行う場合は、それに合うようにスケールを調整する。

ChIPでテストするの各クロマチンサンプルについて、次のテストをする。：

- 興味のあるターゲットの直接の抗体：1又はそれ以上
- ネガティブコントロール：1又はそれ以上(1. 免疫性のないIgG、又は 2. 抗体無添加、又は 3. 特異的なペプチドでブロックした抗体)
- ポジティブ抗体：1又はそれ以上(予備実験で使用)

-
1. キットに入っている5×ストック溶液から、1×ChIP bufferを調製する。 下表参照。
1×ChIP bufferの調製には脱イオン水を使用する。
1×ChIP bufferは4 で保存する。

表5

IP #	ChIP buffer 5×	脱イオン水	ChIP 1×のトータル量
60	300 ml	1.2 L	1.5 L

2. Protease inhibitor mix(P.I. 200×)を溶かす。 ネガティブ及びポジティブ抗体のコントロールを含むChIPで使われる抗体を氷上で溶かす。(4)
1つの断片化クロマチン標品が、数種類の抗体や抗体量で並行して解析される。同じ断片化クロマチンで実行されるChIPの数を決める。
ネガティブコントロールとして、抗体が作られたものと同一種の免疫性のないIgG画分を使用する。
3. 断片化クロマチンを氷上で溶かす、又はその日に調製したフレッシュな断片化クロマチンを使用する。
異なる細胞タイプや、異なるインダクションや処理をした細胞タイプの断片化クロマチンも、並行してテストすることができる。
1 IP：2×10⁶細胞の断片化クロマチン(60 µl)が必要とされる。(7.で60 µlが使用される。) 1.5×10⁶細胞の断片化クロマチン(45 µl)を使うこともできる。**必要があれば容量を調整する。(“TsG”)**
インプット：2×10⁶細胞の断片化クロマチンをキープする(28.)。(“Input”)
(6 µlが28.で使用される。) **必要があれば容量を調整する。**

----- 溶かしている間に、次のことを行う。 -----

4. 新しい1.5 mlチューブにラベルする。各ChIPに対して、1本の1.5 mlチューブが必要である。必要な数の新しいチューブを取り、それらにラベルする（IP用20チューブに：#1～#20）。ラベルしたチューブは氷上に置く。これらは下記の8.で使用する。(4)
5. 新しい15 mlチューブにラベルする（1 ChIPに対して1チューブ、上記の4.と同じ数字が書かれたものを使用する。）。各チューブに12 mlのChIP buffer 1xを添加し、これを低温室又は冷蔵庫に置く。これらは下記39.で使用する。(4)

6. ChIP buffer 1xに、Proteinase inhibitor mix(P.I. 200x)を添加する。(4) これは調製したてのフレッシュな[P.I.-ChIP buffer 1x]を使うためである。
5 mlのChIP buffer 1xに 25 μ lのP.I.を添加する(20 IPに必要な容量)。
[P.I.-ChIP buffer 1x]は、免疫セレクションのインキュベートだけに使用される(下記の7.～11.)。
7. [P.I.-ChIP buffer 1x]を断片化クロマチンに添加する(表6)。ミディアムパワーで5秒間ボルテックスする。(4)
どれくらいのChIPが同じ断片化クロマチンで実行されるのかを考え(上記の2.及び3.参照)、トータルで10%の過剰分を含む希釈されたクロマチンを準備する(表5参照)。
Diagenodeの断片化モジュールで調製した断片化クロマチンを使用する。1 IPあたり60 μ l (2 \times 10⁶細胞相当)の断片化クロマチンを使用する。
断片化クロマチンを [P.I.-ChIP buffer 1x]で希釈することは重要である。(混合液中で最大28%(vol/vol)の断片化クロマチンサンプルを使用する。)(“TsG”)

表6

IP #	断片化クロマチン	P.I.-ChIP buffer 1x	希釈クロマチン トータル容量
1	66 μ l	242 μ l	308 μ l
2	132 μ l	484 μ l	616 μ l
4	264 μ l	968 μ l	1,232 μ l
5	330 μ l	1,210 μ l	1,540 μ l
10	660 μ l	2,420 μ l	3,080 μ l
20	1,320 μ l	4,840 μ l	6,160 μ l

8. 適切にラベルした1.5 mlチューブに、1 IPあたり280 μ lずつ分注する(4.でラベルしたもの)。(4)
1 IPで使用する希釈したクロマチンの容量は280 μ lである(60 μ lの断片化クロマチンと220 μ lのバッファーを含んでいる)。
9. 過剰分は凍結する。これがインプットサンプルに相当する(28 μ l)。
10. サンプルに抗体を添加する。ミディアムパワーで、5秒間ボルテックスする。(4) (“TsG”)
添加する抗体の量は、抗体とターゲットに依存する(トラブルシューティングガイド参照)。
11. 超音波ウォーターバスで30分間インキュベートする。(4) (“TsG”)

ウォーターバスに関する説明は、“キットの構成”とトラブルシューティングガイドの項にある。

インキュベーション時間を最適化したい場合は、トラブルシューティングガイドを参照する。
もしウォーターバスが準備できない場合は、ステップ 1で長時間インキュベートする。そのインキュベーションは抗体とターゲットに依存する(トラブルシューティングガイド参照)。

----- 免疫セレクションのインキュベーションの間に、ビーズを洗浄する。 -----

12. キットに入っているAntibody binding beadsをとる。使用前にビーズ懸濁液を均一にサスペンドする。
ビーズは使用前に洗浄する必要がある(12.~21.)。洗浄したビーズはその日のうちに使うか、1週間以内であれば4℃で保存する。
20 IPに対して840 µlを使用する(IP:#1~#20)。
ビーズ懸濁液をピペットでとるために、1000 µlのピペットチップの先をカットする。
ビーズは懸濁した状態をとる。(“!”)
13. 840 µlのビーズ懸濁液を15 mlのチューブに移す。10.5 mlのChIP buffer 1×を添加し、混ぜるために、2回転倒混和する。これがビーズの洗浄である。
14. 遠心(3分間、500×g(1,500~2,000 rpm))して、ビーズを沈殿させる。(4) (“TsG”)
15. 遠心している間に、新しい1.5 mlチューブにラベルする。各ChIPに対して1本の1.5 mlチューブが必要となる。新しいチューブをとり、それらにラベルする(IPチューブ:#1~#20)。ラベルしたチューブは氷上に置く。これらのチューブは18.で使用する。(4)
16. 遠心が終わったら、ビーズの沈殿を乱さないように、上清を吸い取る。(“!”)
17. ビーズの沈殿に、10.5 mlのChIP buffer 1×を再度添加する。これが2回目の洗浄である。
培養細胞ではなく酵母を取り扱う場合には、ビーズをBSAでブロッキングする必要があるかもしれない。ビーズをブロッキングするために、次のことをする。: 沈殿に10.5 mlではなく5 mlのChIP buffer 1×を添加する。そして、ビーズに50 µlのBlockerを添加する(5 mg/mlの終濃度となる。)。4のローテーターで15分間インキュベートした後、低速(500×g)で2~3分間遠心し、上清を捨てる。ブロッキングしたビーズの沈殿に10.5 mlのChIP buffer 1×を添加する。
18. 洗浄したAntibody binding beadsをラベルした新しいIPチューブに0.5 mlずつ分注する。
Antibody binding beadsは懸濁した状態でチューブに分注する。
19. 遠心(2分間、500×g(2,500~3,000 rpm))して、ビーズを沈殿させる。(4) (“TsG”)
各チューブに等量のビーズの沈殿があることを確認する。(“!”)
20. ビーズの沈殿を乱さないように、上清を吸い取る。(4)
蓋の中にあるバッファも吸い取る。(“!”)
21. 洗浄したAntibody binding beadsの沈殿は氷上に置いておく。- 下記の25まで -
このビーズは、クロマチン免疫沈降のインキュベーションで使用される。(4)

----- 30分間の免疫セレクションが終わったら、次のことを行う。-----

22. 超音波ウォーターバスから[抗体-クロマチン]混合液を含むチューブを取り出す。
23. 遠心 (10分間、14,000 ×g (12,000 rpm)) する。(4)
この段階で他の非特異的なアグリゲートを除去することはとても重要である。 (“!”)
24. 沈殿を乱さない。 (“!”) 上清には[抗体-クロマチン]コンプレックスが含まれている。

ステップ 2: 免疫沈降

この第2ステップは、Antibody binding beadsに、[抗体-クロマチン]コンプレックスを添加することから成っている。 IPインキュベーションの後、洗浄工程に続く。

25. 250 μlの上清 (24. から) を、洗浄したAntibody binding beadsの沈殿 (21. で準備) の入ったチューブに移す。(4)
ビーズの沈殿に、[抗体-クロマチン]混合液を全量は添加しない。
250 μl以上はチューブの外にとらず、残りは捨てる。
チューブの#をチェックする。正しくラベルされたチューブに移したかどうかを確かめる。
26. [抗体-クロマチン-ビーズ]混合液を、30分間、ローテーターでインキュベートする。(4)
インキュベーションは1時間まで行える。

----- 免疫沈降のインキュベーションの間に、次のことを行う。-----

27. 新しい1.5 mlチューブにラベルする。各ChIPに対して、1.5 mlチューブを1本使用する。新しいラベルしたチューブが必要となる (IP チューブ:#1~#20)。氷上にラベルしたチューブを置く。これらのチューブは下記の45. で使用される。(4)
28. 6 μlのインプット (3. の記載のように分注した断片化クロマチン) をとり、100% エタノールを30 μl添加する。これは、分注したインプットのトータルDNAを沈殿させるためである。
(“ Input chromatin ”)
6 μlの断片化クロマチンは、1 IPに使われる量の10%に相当する。(7. 参照)。
9. で調製した28 μlの過剰分を使うこともできる。
29. 氷上で10分間インキュベートする。(4)
30. 遠心 (10分間、10,000 ×g) する。(4)
31. 沈殿を乱さないようにして、上清を吸い取る。沈殿は氷上で冷やしておく。(4)
次のように、75%エタノールで沈殿を洗浄することができる。: 50 μlの75%エタノール (vol /vol) を添加し、再度遠心 (10分間、10,000 ×g) する(4)。沈殿を乱さないようにして、上清を吸い取り、沈殿をキープする。
32. 沈殿を風乾させるため蓋を開けて置いておく。 - 51. まで - (“インプットDNA”)

----- 30分のIPインキュベーションが終わったら、次に進む。 -----

33. [抗体-クロマチン-ビーズ]混合液の入ったチューブをローテーターから外す。
34. すべてのチューブの蓋を開け、各チューブに氷冷したChIP buffer 1×を1 ml添加し、蓋を閉める。
[抗体-クロマチン-ビーズ]の混合液は洗浄される。
ビーズにくっついている[クロマチン-抗体]コンプレックスを単離するために洗浄する。
各遠心の後は、沈殿を乱さないように、上清を除く。
35. チューブを2回転倒混和する。
36. 遠心（2分間、500×g（2,500-3,000 rpm））して、ビーズを沈殿させる。（4）
37. ビーズの沈殿を乱さないようにして、上清を吸い取る。（4）
蓋の中にあるバッファも吸い取る。（“！”）
38. ビーズの沈殿は氷上に置いておく。ビーズの沈殿に、氷冷したChIP buffer 1×を1 ml添加する。
39. 12 mlの冷たい ChIP buffer 1×を含む15 mlのラベルしたチューブ（5.で準備）をとり、チューブの蓋を開ける。
40. 38.でビーズに添加した冷たい1 mlのバッファで、ビーズをサスペンドする。上下に2回ピペッティングして、対応するラベルの15 mlチューブに移す。
チューブの # をチェックする。正しいラベルのチューブに移していることを確かめる。
1 mlの[バッファ-ビーズ]懸濁液を、15 mlチューブに滴下する。
ビーズは沈んでいく間に、12 mlの氷冷したChIP buffer 1×で洗浄される。
41. 15 mlチューブを冷却遠心機（又は低温室）で、5分間インキュベートする。（4）
42. 遠心（3分間、500×g（1,500~2,000 rpm））して、ビーズを沈殿させる。（4）
43. 各チューブの底にビーズの沈殿が見えることを確認する。
44. すべてのチューブのキャップを外し、各チューブに約1 mlのバッファを残して、約12 mlのバッファを吸い取る。
45. 新しくラベルした1.5 mlチューブ（27.で準備）をとり（IP:#1~#20）、蓋を開ける。
46. 残した約1 mlのバッファでビーズの沈殿を再サスペンドし（上下に2回ピペッティング）、[バッファ-ビーズ]を新しい1.5 mlチューブに移す。
チューブの#をチェックする。
47. 遠心（2分間、500×g、（2,500-3,000 rpm））して、ビーズを沈殿させる。（4）
各チューブにビーズの沈殿が見えることを確認する。

48. ビーズの沈殿を乱さないように、上清を吸い取る。(4)
蓋の中にあるバッファも吸い取る。(“!”)
この最後の洗浄では、バッファを最後の一滴まで慎重に除く。
49. ビーズの沈殿をキープし、蓋を開けて、チューブを室温に放置する。(室温)
ビーズに結合した[クロマチン-抗体]コンプレックス が単離された。
もう氷上で作業する必要はない。
この後のステップからは、フィルターつきチップを使用する。
この後のステップからは、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、DNAが精製される(次のポイントに進む)。

ステップ 3: DNA精製

このステップの目的は、IPしたクロマチンからDNAを単離することである。

50. 沸とう浴を準備する。
51. 乾燥した“インプットDNA”の沈殿(32.)に100 µlの水を添加する。乾燥した沈殿をサスペンドする。室温でインキュベートする。- 54.まで -
52. キットに入っているDNA purifying slurryをとる。DNA purifying slurryは、ピペットでとる度に、均一な懸濁液となるようにサスペンドする。
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。
各チューブに分注する前に、上下にピペッティングする。
53. 49.で洗浄したビーズに、100 µlのDNA purifying slurryを直接添加する。
これらがIPサンプルである。
ポジティブIPサンプルは、[クロマチン-抗体-ビーズ]コンプレックスを含む。
スラリーは懸濁した状態で分注する。(“!”)
1分間待つ。その間、54.に進む。
その後、各チューブに等量入っていることを確認する。
54. 51.のインプットDNAに、100 µlのDNA purifying slurryを直接添加する。
これが“インプット”サンプルである。
スラリーは懸濁した状態で分注する。(“!”)
1分間待つ。その間、53.の沈殿のチェックに戻る。
その後、各チューブに等量入っていることを確認する。
55. 53.と54.のチューブを転倒混和する。
このステップからは、IPとインプットサンプルの両方を並行して進める。
56. チューブクラブでチューブをロックする。(“!”)
57. 沸とう浴で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。 -----

58. サーマミキサーのスイッチを入れ、温度を55 にセットする。
59. キットに入っているProteinase Kを氷上で溶かす。
60. 新しい1.5 mlチューブにラベルする。 必要な数の新しいチューブをとり、それらにラベルする (IPチューブ：#1~20とインプットサンプル)。 チューブは71.で使用する。(室温)

----- 10分間のボイルが終わったら、次に進む。 -----

61. 沸とう浴からチューブを取り出す。
沸とう浴は69.で再度必要となる。
62. チューブクラブを外し、サンプルが冷めるまで待つ。
63. 各サンプルに、1 μ lのProteinase Kを添加する。
フィルターチップを使用する。
64. ミディアムパワーで2秒間ボルテックスする。
65. 55 のサーモミキサーで1,000 rpmで、30分間、サンプルを振とうする。

----- 30分間のインキュベーションの間に、次のことを行う。 -----

66. その日のうちにPCRを行うことを計画している場合、使用するPCRプライマーと、コントロールを決める。
テストされる興味のあるターゲット
ネガティブコントロール： 1つ又はそれ以上
ポジティブコントロール： 1つ又はそれ以上
67. プライマーペアを氷上で溶かす。チューブ又はプレートを準備する。

----- 30分間のインキュベーションが終わったら、次に進む。 -----

68. チューブクラブでチューブをロックする。(“!”)
69. 沸とう浴で10分間、サンプルをインキュベートする。
70. 遠心(1分間、14,000 \times g (12,000 rpm))する。(4)
71. 沈殿を乱さないようにして、70 μ lの上清を新しい1.5 mlチューブ(60.で準備)に移す。
沈殿が入らないように注意する。沈殿の残留は、この後のPCRに影響する。(“!”)
72. 沈殿に130 μ lのPCR-grade H₂Oを添加する。
73. ミディアムパワーで10秒間ボルテックスする。

74. 遠心 (1分間、14,000 × g (12,000 rpm)) する。 (4)
75. 130 μlの上清を回収し、71.の上清と合わせる。各サンプルのトータル量は200 μlである。ChIPとインプットサンプルからDNAが精製され、PCRで解析されるために準備された。すぐにPCRステップへ進む、又はすべてのサンプルを凍結する。 (“STOP”)
-20 で保存する。

ステップ 4 : 定量PCRとデータ解析

この最終ステップは、IPしたDNAの増幅と解析を含んでいる。

定量PCR

クロマチン免疫沈降で得られるDNA量はとても微量であるが、特異的なプライマーを使ったリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (定量PCR) によって、増幅することができる。

PCRサイクルで増幅された二本鎖DNAの量は、サイバークリーンのようなインターカレートした色素の蛍光によって定量される。信頼性のある定量結果を得るために、いくつかの基準の慎重なアプローチが必要となる。後述の “定量PCR 備考” 参照。

各ChIPでは、80回の定量PCRに十分な量のDNAが得られる。

PCRプレートで、1ウェルあたり10 μl PCR容量に、2.5 μlのChIPから得られた精製DNAを使用する。

インプット DNAも同様にPCRで解析されるが、使用する前に希釈する必要がある。

(1:10希釈は、1 μlあたり終濃度100細胞のインプットDNAに相当する。)

PCRプレートで、1ウェルあたり10 μl PCR容量に、2.5 μlのインプットから得られた精製DNAの希釈液を使用する。

PCRミックス1ウェルには次のものが含まれる。: 2.5 μlのDNAテンプレート、5 μlの定量PCRバッファーミックス、2.2 μlの水、0.3 μlのプライマーペア (各10 μM)。各PCRは3点 (3ウェル) で実施する。

76. 定量PCRバッファーミックスを氷上で溶かす。 (4)
バッファーミックスは、IQ SYBR Green supermix や、研究室で使用しているその他のものが使用できる。サプライヤーの情報に従う。
77. 定量PCRバッファーミックスに次のように水を添加する。 (4)
実行されるPCRのウェル数がnの場合は、n + 1ウェル分の試薬を混合する。例えば、3 ウェルに対しては、8.8 μlの水を20.0 μlのバッファーミックスに添加する (4ウェル分)。メディアパワーで4秒間ボルテックスする。
78. 3ウェルに対して、1.2 μlのプライマーセット (10 μM) を添加する (4ウェル分)。 (4)
79. [バッファー 水 プライマー]の容量が過剰に準備されていること、最終容量が正しいことをチェックする。(30 μl (4ウェル分) が準備され、22.5 μl (3ウェル分) が使用される。) (4)
80. PCRプレートに、1ウェルあたり2.5 μlのDNAテンプレートを添加する (3点 (3ウェル))。 (4)

81. PCRプレートに、1ウェルあたり7.5 μ lの[バッファー 水 - プライマー] ミックスを分注する。(4)
82. プレートをオプティカル接着シートでカバーする。
83. 遠心(2分間、500 \times g (2,500~3,000 rpm))する。(4)
84. 使用するプライマーペアに合わせた条件(サイクルと温度)を使ってPCRを実行する。

データ解析

85. データはPCR装置のプログラムを使用して得られる(例、ABI)。各プライマーペアに対して、スレッシュホールドとベースラインが自動的に決められる。
86. データはエクセルのスプレッドシートにエクスポートされる。
87. 遺伝子座の免疫沈降したファクターのRelative occupancyは、次の式を使って計算される。

$$\text{Relative occupancy} = 2^{(\text{Ct}_{\text{NegCt1}} - \text{Ct}_{\text{Target}})}$$

$\text{Ct}_{\text{NegCt1}}$ と $\text{Ct}_{\text{Target}}$ は、DNA 3点(3ウェル)で実行されたPCRの、ネガティブコントロールChIP(免疫性のないIgGを使用)とターゲットChIP(特異的抗体を使用)のスレッシュホールドサイクルを意味している(4)(図1及び2)。(“TsG”)

定量PCR 備考:

プライマーデザイン

- プライマーのセルフコンプリメントリーや2次構造はプライマーデザインでテストできる。
(http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)。定量PCR用プライマーは、アニーリング温度 60 を推奨する。
- 短い増幅長(50~100 bp)は、PCRの効率を促進し、G/Cリッチ領域の増幅の問題のポテンシャルを減少する。
- 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べきである。
- プライマーの3'末端のG/Cの濫用は避けるべきである。

プライマーのバリデーション

- プライマーセットをsilico PCRでテストする。:<http://genome.cse.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>
プライマーはゲノムから唯一のDNA産物を増幅しなければならない。
- インプットDNAの10倍連続希釈を使ったPCRで、すべてのプライマーセットをテストする。得られた曲線(カーブ)の傾きで、次の式によってプライマーセットの増幅効率(AE)を計算する(5)。

$$\text{AE} = 10^{(-1 / \text{傾き})}$$

増幅効率が2であれば信頼性は高い。問題のない場合でも、異なるブランドの定量PCR試薬や、新しいプライマーはテストされるべきである。

データの解釈

- **Positive IP / Negative IP** は、ChIPの効率やChIPの特異性を確定し、前述したようなChIPデータを示すために用いることができる (87. と図1を参照)。
- 特定ゲノム領域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もできる (回収したインプットの%)。

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

このAEは先に計算した増幅効率である(5)。 Ct_{ChIP} と $Ct_{\text{インプット}}$ 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PCRに使ったChIPのDNAと、インプットのDNAの量差のバランスをとる希釈係数である。

Relative occupancyはバックグラウンドに対する特異的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。

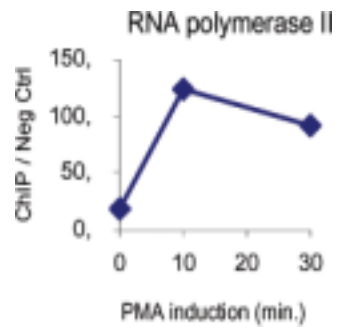
略語リスト

- (“**TsG**”): **トラブルシューティングガイド**を参照する。
- (“**STOP**”): その段階で止めることができる。詳細は**トラブルシューティングガイド**を参照する。
- (**4°C**): 氷上 又は 低温室 又は 冷蔵庫で作業することが必須である。
- (**室温**): 室温で作業する。
- (“**インプット**”): ChIPで使われる断片化クロマチンのインプットサンプル。
- (“**!**”): 重要ステップ。プロトコールに記載されているように行ったか確かめる。

OneDay ChIP Kit を使った実験例 :

OneDay ChIP kit

図1 (ChIPの結果 : 定量PCR) :



DiagenodeのOneDay ChIP Kitで得られたChIPの結果

使用した細胞 : hepatoma HTC - IR細胞

0 min. : 誘導なし

10 min. : 0.1 μ M PMA (phorbol 12- myristate 13-acetate) で10分間誘導

30 min. : 0.1 μ M PMA (phorbol 12- myristate 13-acetate) で30分間誘導

使用した抗体 : 抗 RNA polymerase 抗体

断片化クロマチンの調製 : “ in house プロトコール

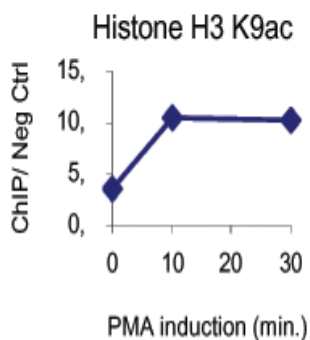
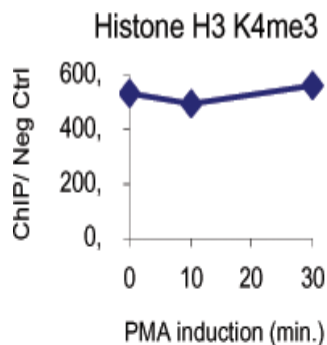
ChIPのネガティブコントロール : Negative Ctrl IgG from rabbit

PCRプライマー設計領域 : PMAで誘導される egr promoter

データ解析 : マニュアル記載の方法 (“ 定量PCR ” セクション : ステップ 4-87.)

図 2 (ChIPの結果：定量PCR)：

OneDay ChIP kit



DiagenodeのOneDay ChIP Kitで得られたChIPの結果

使用した細胞： hepatoma HTC - IR細胞

0 min. : 誘導なし

10 min. : 0.1 μ M PMA (phorbol 12- myristate 13-acetate) で10分間誘導

30 min. : 0.1 μ M PMA (phorbol 12- myristate 13-acetate) で30分間誘導

使用した抗体： 抗修飾ヒストンH3抗体

antibody directed against H3[K4me3]

antibody directed against H3[K9ac]

断片化クロマチンの調製： “ in house プロトコール

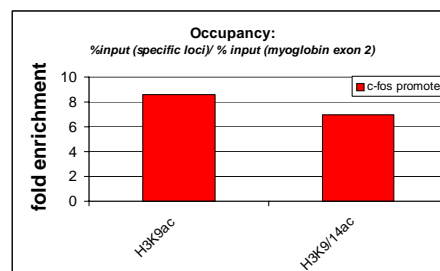
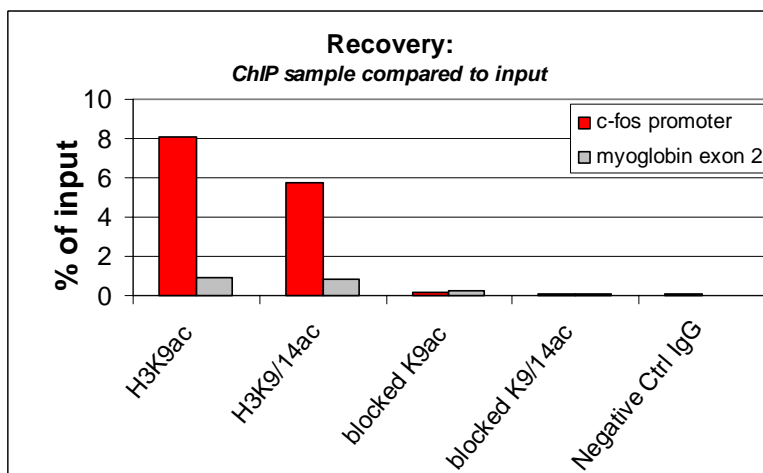
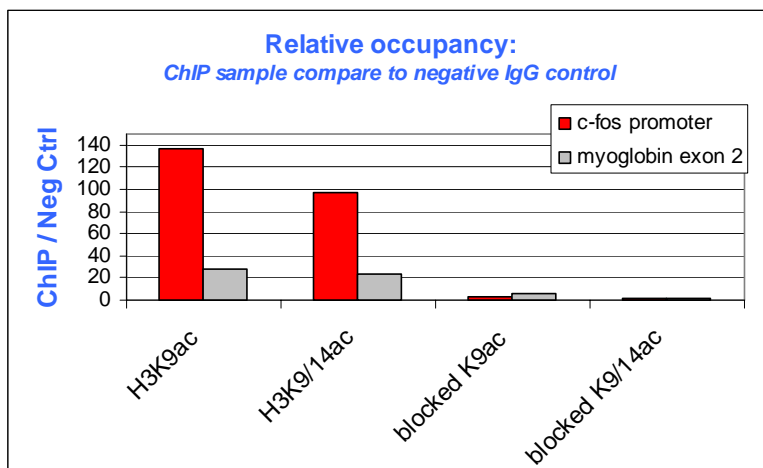
ChIPのネガティブコントロール： Negative Ctrl IgG from rabbit

PCRプライマー設計領域： PMAで誘導される egr promoter

データ解析： マニュアル記載の方法 (“ 定量PCR ” セクション：ステップ 4-87.)

図 3 (ChIPの結果：定量PCR)：

Shearing module + Bioruptor + OneDay ChIP kit



Diagenode の OneDay ChIP Kitで得られたChIPの結果

使用した細胞： HeLa細胞

使用した抗体： 抗アセチル化ヒストンH3抗体 (Diagenode) , 1 ChIPあたり2 µg
antibody directed against H3[K9ac], antibody directed against H3[K9/14ac]

断片化クロマチンの調製： Red ChIP Kitの断片化モジュール, 1 ChIPあたり60 µl (2×10⁶細胞分)

ChIPのネガティブコントロール： Negative Ctrl IgG

PCRプライマー設計領域： c-fos promoter, myoglobin exon 2

その他のコントロール (IP及びPCRの特異性確認ため)：

- a/ myoglobin exon2プライマーで実施したPCR (ネガティブコントロール)
- b/ すべてのプライマーセットとインプットサンプルで実施したPCR (ポジティブコントロール)
- c/ ブロック抗体を使ったChIP (IPの前に抗体を抗体製造に使用されたペプチドとブレインキユベートしたもの)

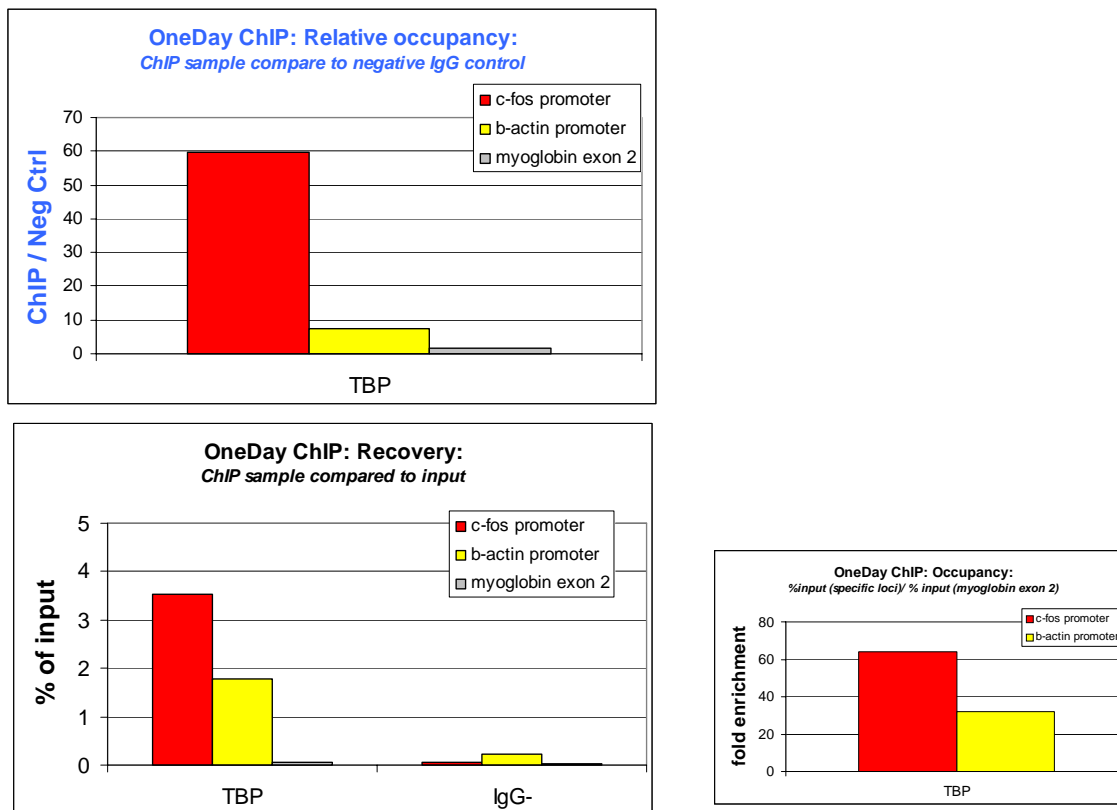
データ解析： マニュアル記載の方法 (“定量PCR”セクション：ステップ 4-87.)

上のグラフ： Relative occupancy

下のグラフ： % of input (recovery) と Occupancy

図 4 (ChIPの結果：定量PCR)：

Shearing module + Bioruptor + OneDay ChIP kit



DiagenodeのOneDay ChIP Kitで得られたChIPの結果

使用した細胞： HeLa細胞

使用した抗体： antibody directed against TBP (Diagenode), 1 ChIPあたり5 μ g

断片化クロマチンの調製： Red ChIP Kitの断片化モジュール, 1 ChIPあたり60 μ l (2×10^6 細胞分)

ChIPのネガティブコントロール： Negative Ctrl IgG

PCRプライマー設計領域： c-fos promoter, b-actin promoter, myoglobin exon 2

その他のコントロール (IP及びPCRの特異性確認ため)：

a/ myoglobin exon2プライマーで実施したPCR (ネガティブコントロール)

b/ すべてのプライマーセットとインプットサンプルで実施したPCR (ポジティブコントロール)

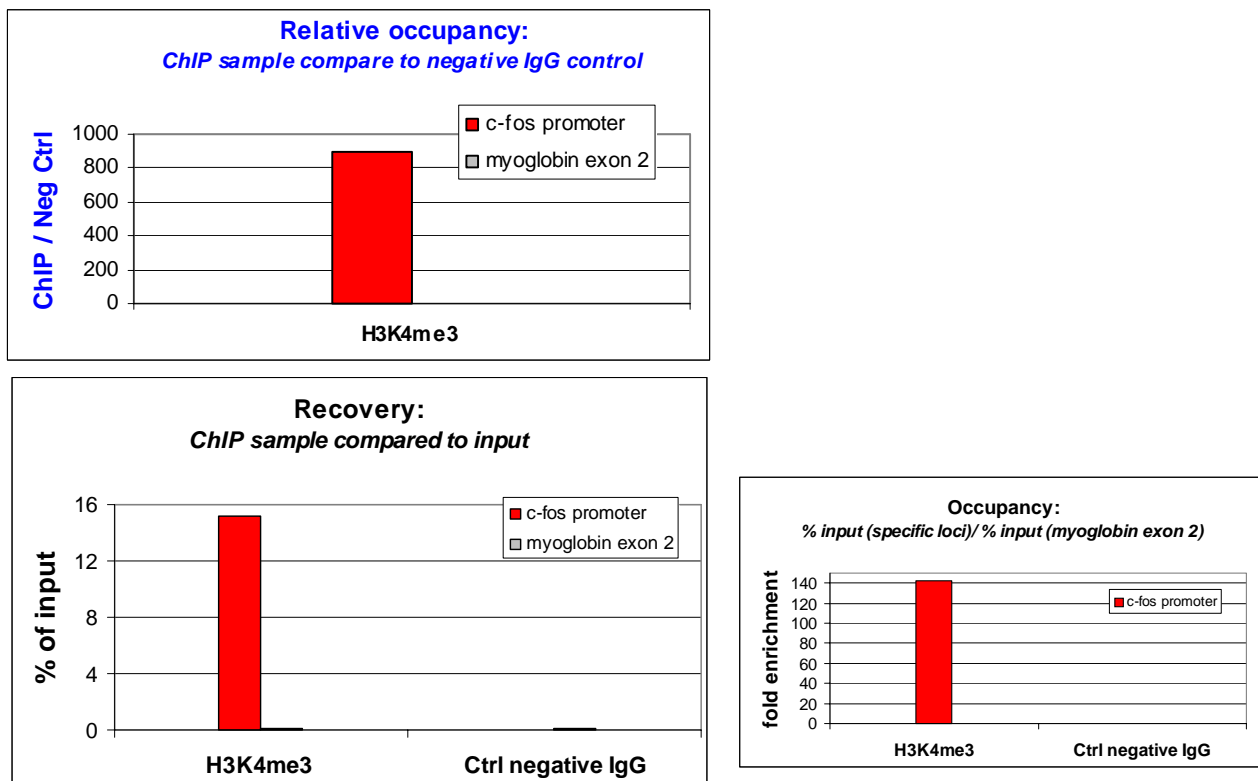
データ解析： マニュアル記載の方法 (“ 定量PCR ” セクション：ステップ 4-87.)

上のグラフ： Relative occupancy

下のグラフ： % of input (recovery) と Occupancy

図 3 (ChIPの結果：定量PCR)：

Shearing-ChIP kit + Bioruptor + OneDay ChIP



DiagenodeのOneDay ChIP Kitで得られたChIPの結果

使用した細胞： HeLa細胞

使用した抗体： antibody directed against H3 [K4me3] (Diagenode), 1 ChIPあたり2 μ g

断片化クロマチンの調製： Shearing ChIP Kit, 1 ChIPあたり60 μ l (1.5×10^6 細胞分)

ChIPのネガティブコントロール： Negative Ctrl IgG

PCRプライマー設計領域： c-fos promoter, myoglobin exon 2

その他のコントロール (IP及びPCRの特異性確認ため)：

a/ myoglobin exon2プライマーで実施したPCR (ネガティブコントロール)

b/ すべてのプライマーセットとインプットサンプルで実施したPCR (ポジティブコントロール)

データ解析： マニュアル記載の方法 (“定量PCR”セクション：ステップ 4-87.)

上のグラフ： Relative occupancy

下のグラフ： % of input (recovery) と Occupancy

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かめる（終濃度1%のホルムアルデヒド(w/v)で、10分間、室温でインキュベート等）。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に直接結合してはいないが、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ト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。125 mM グリシンで5分間処理してホルムアルドの反応を止める（1 mlの培地に対して、1.25 M グリシンを110 µl添加）。又は、固定化した細胞を適当に洗浄し、すべてのホルムアルドを除いたことを確認する。
細胞の溶解	細胞が完全に破砕されていない。	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）。プロトコールの説明に従う（ $1.5 \sim 2 \times 10^6$ 細胞/100 µl）。
	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、氷冷したバッファを使用する。
	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）をバッファに添加する。
1 ChIP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、 2×10^6 細胞の使用を推奨する。 2×10^6 より少ない細胞で良い結果が得られたケースもある。また、1 ChIPあたり 5×10^6 細胞までは使用できる。
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、断片化条件を至適化する場合。 1)少量のサンプル(3×10 ⁶ 細胞)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。(断片化バッファーが0.75% SDSを含んでいる場合は、免疫沈降の前に、断片化クロマチンを[P.I. ChIP buffer 1×]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のBioruptor™で切断する。	サンプルの温度を0 近くに保つ。サンプルを10サイクル超音波破碎する。:各サイクル[30秒間“ON”/30秒間“OFF”]。トータル時間は10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。
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、75.で断片化したクロマチンのインプットから精製したDNA 10µlをとる。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。28.~32.、51.~75.)。
	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%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実験で使用されるが、ChIP実験のインプットサンプルに相当するコントロールが必要となることと、アガロースゲルでチェックするものがあ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、[P.I. ChIP buffer 1×]で希釈される。断片化したクロマチンを少なくとも3.5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 xg、2~3分間)を使用する。 $g = 11.18 \times r \times (\text{rpm}/1000)^2$; rは回転半径(mm)。1.5 mlチューブを使って、1,000~2,000 xgで20秒間遠心することもできる。
	ビーズの保存	4 で保存し、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)のモノクローナル抗体、ラット(IgG2c)。

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。
	P.I.-ChIP 1x buffer	使用する直前に P.I. mix を ChIP buffer 1xに添加する。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。	研究フィールドや、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ChIP buffer 1xに添加する。
ChIPのネガティブコントロール (Negative ChIP control(s))	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種の免疫性のないIgG画分を使用する。87.参照。
	IPに抗体を添加しない。	ステップ 1において、断片化したクロマチンに抗体を添加しない。したがって、ステップ 2の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Antibody binding beadsを含むが抗体は含まない。抗体なしのビーズとのインキュベーションも、ネガティブChIPのコントロールとして、免疫性のないIgGと同様に使用される。87.参照。
	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クした抗体と、ブロック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、IPインキュベーションミックスで使用する前に、抗体をエピトープに特異的なペプチドで飽和して30分間 室温でブレインキュベートする。ブロックしていない抗体と一緒にChIPで並行して使用し、ネガティブコントロールとする。
	ネガティブコントロールはどの程度必要か？	同じ種類の複数の抗体が、同じクロマチン沈降で使われる場合は、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、クロスリンクステップの結果として生じた、影響を受けやすいエピトープや認識のロスに、大いに作用される。
	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む。
	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し、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で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、経験に基づき決められるべきである。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、1~2 µg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あたり最大で10 µg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。抗原の特異性の低い場合や、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の効率が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ネティクスは、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もあるかもしれない。)
	超音波ウォーターバスを使った免疫セレクションは、どのように行うのか？	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ネティクスと関係がある。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.bransoninc.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何か？	型式 MT-3510、タンク容量: 5.5 liters、洗浄槽寸法: 29 × 15 × 15 cm、周波数: 42 kHz、最大要求パワー: 130 W、RF-パワー: 130 W。
	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 プライマーのT _m : 60 (±3.0) プライマーの%GC: 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IPしたサンプルのDNAを使ったPCR。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む。
	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かめる。: 23. の遠心。 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の等量の沈殿が入っていることを確認したか。 39. ～49. の洗浄。 20.、37.、48. で、バッファーを完全に吸い取ったか。
	定量PCRではなく、エンドポイントPCRを使用している。	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IP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は、サンプルを凍結できる。	<ul style="list-style-type: none"> - 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。 - ChIPされる興味のあるタンパク質によっては、断片化したクロマチンは-80 で1ヶ月間保存できる。 - ChIPとインプットサンプルから精製したDNAは、-20 で数ヶ月間保存できる。
	凍結/融解の繰り返しを避ける。	瞬間凍結し、氷上で溶かす（固定化した細胞ペレット、断片化したクロマチン）。

追加プロトコール：クロマチン断片化の方法

重要事項：

各 ChIP は $1.5 \sim 2 \times 10^6$ 細胞分の断片化クロマチンを必要とする。それに合わせて、スケールは調整する。

概要：

インダクションや処理をした細胞も使用することができる。これらの細胞は未処理の細胞と同様に調製でき、ChIPで研究される。細胞がコンフルエントに達したら、プロトコールを開始する。

クロスリンクと細胞の回収

1. ホルムアルデヒドを培地の上に添加し、インキュベートする。
ホルムアルデヒドはドラフト内で取り扱う。
ホルムアルデヒドの終濃度は $1 \sim 1.5\%$ で使用する。
細胞と興味のあるターゲットによって、 $5 \sim 15$ 分間インキュベートする。
2. グリシン（終濃度 125 mM 、室温で5分間）でホルムアルデヒドの反応を止める。
3. 細胞を剥ぎ取り、遠心して回収し、氷冷したPBSで2回洗浄する。
クロスリンクの後、サンプルはずっと氷冷しておく。
4. 細胞を数える。
5. 再度遠心して、細胞ペレットを回収する。
細胞ペレットは凍結することができる。 (“ STOP ”)
6. 細胞ペレットに、プロテアーゼ阻害剤を含む溶解バッファーを添加する。数回上下にピペティングして、ペレットを再サスペンドする。遠心しペレットをキープする。 (4)
7. 細胞核のペレットに、阻害剤を含む溶解バッファーを加え、ペレットを再サスペンドし、遠心する。上清を捨て、洗浄したペレットをプロテアーゼ阻害剤を含むシェアリングバッファーに再サスペンドする ($1.5 \sim 2 \times 10^6$ 細胞/ $60 \mu\text{l}$)。これがクロマチンサンプルである。 (4)

クロマチン断片化

8. クロマチンサンプルを断片化する。 (4) DNA断片の至適サイズは $0.5 \sim 1 \text{ kb}$ である。
(http://www.diagenode.com/pages/bioruptor_troubleshoot.html 参照)。
9. 遠心し、上清をキープする。これがChIP用に断片化したクロマチンである。
10. 断片化したクロマチンを (2×10^5 細胞ずつ) 新しい 1.5 ml チューブに分注する。これがインプットサンプルに相当する。インプットサンプルのトータルDNAはコントロールとして単離される。： 1) ChIP解析におけるインプットDNA (3. 及び 28.)、2) 断片化効率 (トラブルシューティングガイド参照)。 (“ Input ”)
11. 断片化したクロマチンはChIPで使用するために準備する。調製したてのフレッシュなクロマチンを直接ChIP解析に使用する。(ChIP解析する) 興味のあるタンパク質によっては、断片化したクロマチンを分注し -80 で凍結することもできる。 (“ STOP ”)

Diagenode の Bioruptor と断片化メソッドを使ったクロマチンの断片化：

- Red ChIP Kit の断片化モジュール
- Shearing ChIP Kit

1/ ChIP用の断片化クロマチンを Red ChIP Kit の断片化モジュールで調製し、従来法の Red ChIP Kit、又は迅速法の OneDay ChIP Kit で ChIP を行う。

p 8 “スターティングマテリアル” を参照。

2/ ChIP用の断片化クロマチンを Shearing ChIP Kit で大量に調製する。

Shearing ChIP Kit には、高品質な断片化クロマチンを大量に調製するための、至的化されたバッファーとユーザーフレンドリーなプロトコルが含まれる。キットのプロトコルのメインステップはキットのマニュアル及び下記（表 7）に記載されている。

細胞を培養しコンフルエントに達したら、プロトコルを開始する。OneDay ChIP アッセイ及びクロマチンの断片化に必要な細胞数とバッファー量については、表 7 を参照する。

Shearing ChIP Kit に入っている至適化されたバッファーを使用して、断片化クロマチンを調製する。キットには 1.5×10^8 細胞から ChIP 用の断片化クロマチン調製するためのバッファーが入っており、最大で 100 IP に使用できる。下表にサンプルサイズに合わせたバッファー量を示す。1 サンプルは最小で 6×10^6 細胞からなり、最大で 3×10^7 細胞のクロマチンを断片化することができる。それより多い細胞数を処理する場合は、スケールを調整する。OneDay ChIP Kit の免疫沈降（IP）1 サンプルあたり、60～80 μ l の断片化クロマチンを使用するように調製する（表 7）。

表 7： 1 サンプルあたりのバッファー量 ステップ バイ ステップ

Shearing ChIP kit		
ステップとバッファー	容量	コメント
スターティングマテリアル： 1.5×10^8 細胞	-	3×10^7 細胞ずつ 5 サンプルで行う
細胞の固定と回収： DTT-Buffer A	18 ml	3×10^7 細胞 / 3 ml
溶解 1： Buffer B	18 ml	3×10^7 細胞 / 3 ml
溶解 2： Buffer C	18 ml	3×10^7 細胞 / 3 ml
クロマチン断片化： P.I.-Buffer D (ChIP 用 断片化クロマチン調製)	18 ml	3×10^7 細胞 / 1200 μ l
実施できる OneDay ChIP の数：	75 IP (最大)	1 OneDay ChIP あたり <u>80 μl</u> の断片化クロマチン使用 (2×10^6 細胞相当)
	100 IP (最大)	1 OneDay ChIP あたり <u>60 μl</u> の断片化クロマチン使用 (1.5×10^6 細胞相当)

6. 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. Pokholok D.K., Harbison C.T., Levine S., Cole M., Hannett N.M., Lee T.I., Walker K., Lewitter F., Rolfe P.A., Herbolsheimer E., Bell G.W., Zeitlinger J., Gifford D.K., Young R.A. 2005. *Cell* 122(4):517-27.
5. Pfaffl MW. 2001. *Nucleic Acids Res.* 29(9):e45.

7. 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
HP: <http://www.diagenode.com/>

Diagenode Inc. USA

3701 Market Street, 3rd Floor, Philadelphia, PA 19104
TEL : +1 (215) 966 6076 FAX: +1 (215) 966 6001
E-mail: infousa@diagenode.com
HP: <http://www.diagenode.com/>