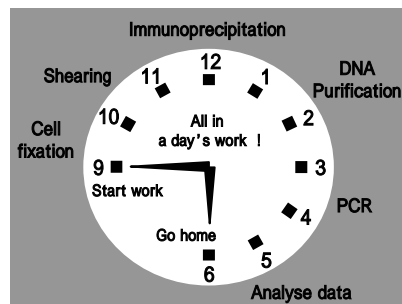


キット内容 60回用

内容	容量	保存温度
ChIP buffer 5 ×	300 ml	室温
Protease Inhibitor mix (P.I. 200 ×)	100 μl	-20
Antibody binding beads	2,800 μl	4
Negative Ctrl IgG from rabbit	100 μl	4
Blocker for ChIP Ab binding beads	200 μl	-20
DNA purifying slurry	10 ml	4
Proteinase K	100 μl	-20
PCR-grade H ₂ O	28 ml (14 ml × 2本)	4



キット以外に準備するもの

断片化クロマチン(その日に調製したもの、又は-80 で凍結保存しておいたもの)、ChIP グレード抗体

その他の試薬・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
(先をカットしたピペットチップ(Antibody binding beads に使用))
- ・フィルターチップ
- ・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)

- (・定量PCR(又はエンドポイントPCR)試薬)
- (・アガロース及びTAEバッファー)

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)
(ブランソニック B3510-MT(Branson))
- ・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)
- (・アガロースゲル電気泳動装置一式)

バッファーの準備

- ・ChIP buffer 5 × を脱イオン水で希釈して、ChIP buffer 1 × を調製する。
(ChIP buffer 1 × は4 で保存する。)
- ・Protease Inhibitor mix (P.I. 200 ×) を溶かす。
- ・抗体を氷上で溶かす。
- ・断片化クロマチンを氷上で溶かす。(凍結保存していたものを使用する場合。)
- ・ラベルした 1.5 mlチューブを氷冷する。
- ・15 mlチューブに、ChIP buffer 1 × を12 mlずつ分注し、低温室又は冷蔵庫で冷やしておく。
- ・P.I. ChIP buffer 1 × を調製する。(使用する直前に調製する)。
(20 IP分の場合 : 5 ml の ChIP buffer 1 × に、25 μl の P.I. を添加する。)

メインプロトコールは裏面

Antibody binding beadsの洗浄 * (20 IP分の場合)

(免疫セレクション(裏面)の間に行う)

Antibody binding beads を均一にサスペンドする。

Antibody binding beads 840 μlを、15 mlチューブに移す。

10.5 mlのChIP buffer 1 × 添加、転倒混和2回
遠心(3分間、500 × g、4)

ビーズの沈殿を乱さないように、上清を除く。

沈殿(ビーズ)
10.5 mlのChIP buffer 1 × 再度添加 **
1.5 mlチューブに 0.5 mlずつ分注する。

遠心(2分間、500g、4)

沈殿(ビーズ)
ビーズの沈殿を乱さないように、上清を除く。

洗浄済みAntibody binding beads
(免疫沈降(裏面)で使用する。使用するまでは氷冷しておく。)

インプットサンプルの調製

(免疫沈降(裏面)の間に行う)

断片化クロマチン 6 μl

100 % エタノール 30 μl 添加
インキュベート(10分間、氷上)
遠心(10分間、10,000 × g、4)
沈殿を乱さないように、上清を除く。

沈殿
75% エタノール 50 μl 添加
遠心(10分間、10,000 × g、4)
沈殿を乱さないように、上清を除く。

沈殿
風乾

インプット DNA
PCR-grade H₂O 100 μl 添加
インキュベート(室温)
DNA purifying slurry 100 μl 添加し1分間置く。

以降の操作は、ChIPサンプルと同じ(並行して進める)。

*: ビーズをピペットでとるときは、必ず懸濁してとること。

** : 酵母を取り扱う場合は、ビーズをBlockerでブロッキングする。(詳細については Instruction Manual 参照)

ChIPプロトコール

培養細胞

細胞固定・回収
細胞溶解
クロマチン断片化

キットには、断片化クロマチン調製用試薬は含まれておりません。

4 で操作

断片化クロマチン

P.I. ChIP buffer 1 × 添加、ボルテックス(ミディアムパワー、5秒間、4)

氷冷した 1.5 ml チューブに 280 μl ずつ分注

希釈した断片化クロマチンを 280 μl (60 μl 断片化クロマチン + 220 μl バッファー)

断片化クロマチン 60 μl に対して
P.I.-ChIP buffer 1 × 220 μl を添加。
Instruction Manual Table 6 (表6) 参照

抗体添加、ボルテックス(ミディアムパワー、5秒間、4)

[抗体-クロマチン] 混合液

超音波ウォーターパスでインキュベート(30分間、4)

遠心(10分間、14,000 × g、4)

このインキュベート(免疫セレクション)の間に
Antibody binding beads を洗浄する。
(表面参照)

上清 250 μl

上清を洗浄済 Antibody binding beads (表面参照) のチューブに移す。

[抗体-クロマチン-ビーズ]

ローターでインキュベート(30分間、4)

氷冷した ChIP buffer 1 × 1 ml 添加、転倒混和 2回

遠心(2分間、500 × g、4)

ビーズの沈殿を乱さないように、上清を除く。

このインキュベート(免疫沈降)の間に
インプットサンプルを調製する。
(表面参照)

沈殿(ビーズ)

氷冷した ChIP buffer 1 × 1 ml 添加、サスペンド(ピペティング2回)

冷たい ChIP buffer 1 × 12 ml の入ったチューブに移す。(滴下する。)

インキュベート(5分間、4)

遠心(3分間、500 × g、4)

約 1 ml のバッファーを残して、上清を除く。

沈殿 + バッファー 約 1 ml

残したバッファーでサスペンド(ピペティング2回)

氷冷した 1.5 ml チューブに移す。

遠心(2分間、500 × g、4)

4 で操作

沈殿

蓋を開けて室温で放置する。

DNA purifying slurry 100 μl 添加し、1分間置く。

転倒混和

チューブクラブでチューブをロックする。

ポイル(10分間、100)

チューブクラブをはずし、サンプルが冷めるまで待つ。

Proteinase K 1 μl 添加、ボルテックス(ミディアムパワー、2秒間)

サーモミキサーでインキュベート(1,000 rpm、30分間、55)

ポイル(10分間、100)

遠心(1分間、14,000 × g、4)

沈殿を乱さないように、
70 μl を新しいチューブ
に移す。

上清 (70 μl)

沈殿

PCR-grade H₂O 130 μl 添加、ボルテックス(10秒間)

遠心(1分間、14,000 × g、4)

上清 (130 μl)

精製DNA (200 μl) (すぐに使用しない場合は -20 で保存する。)

定量PCR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