

OneDay ChIP Kit 使い方

(株)ニッポンジーン 研究試薬部

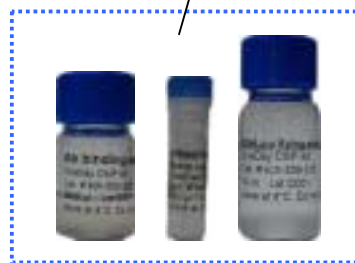
2007年3月

キット内容

白箱 (低温輸送)

ChIP buffer 5 × 300 ml
(室温保存)

1 × に希釈して使用する。
(1 × bufferは4 保存。)



青い14 箱の中に以下のものが入っている。
(4 保存)

Antibody binding beads 2.8 ml
Negative Ctrl IgG from rabbit 100 μl
DNA purifying slurry 10 ml



PCR-grade H₂O
14 ml × 2
(4 保存)

-20 箱 (ドライアイス輸送)



青い-20 箱の中に以下のものが入っている。
(-20 保存)

Protease Inhibitor mix
(P.I. 200 ×) 100 μl
Blocker for ChIP Ab
binding beads 200 μl
Proteinase K 100 μl

マニュアル類 (Instruction Manual (英語版、日本語訳、日本語簡易プロトコール)

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

- ・ 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)

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)



はじめる前に

対応する Instruction Manual
(英語版 version 1、日本語訳 1.01版)
の項目番号 : 1. 2. 3. 4. 5. 6.

- ・ 使用する断片化クロマチン、使用する抗体、コントロール(ポジティブ、ネガティブ)を決める。

試薬の準備

- ・ 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。)
- ・ Proteinase Inhibitor mix (P.I. 200 ×)を溶かす。(使用直前に溶かし、使用後はすぐに -20 で凍結して保存する。)
- ・ 抗体を氷上で溶かす。
- ・ 断片化したクロマチンを氷上で溶かす。(凍結保存していた断片化クロマチンを使用する場合。)
- ・ ラベルした1.5 ml チューブを氷上で冷やしておく。
(ここでは免疫セレクションで使用するチューブを準備する。免疫沈降で使用するチューブはビーズの準備の工程で、ビーズの洗浄工程で使用するチューブは免疫沈降のインキュベーションの間に、精製したDNAを入れるチューブは DNA purifying slurry をボイルしている間に準備する。)
- ・ 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。
(このチューブはビーズの洗浄工程で使用する。)
- ・ P.I. – ChIP buffer 1 × を調製する。
(使用する直前に調製する。)



超音波ウォーターバスの準備

[超音波ウォーターバスに氷と水を入れる。]



たっぷり氷を入れた超音波ウォーターバス(ブラソニック B3510-MT)に水を入れ、よくかき混ぜ、水が十分に冷たくなったら、余分な氷を取り除く。インキュベート開始時の氷の量は、約1 cm程度の厚さで水面全体に広がる程度にする(氷を入れすぎない)。

備考:

ブラソニック B3510-MTには温度調節機能はついていない。したがって、30分間のインキュベート終了時には、ほとんどの氷が溶けているが水温は上がっていない状態(まだ少しだけ氷が残っている状態)になる。

このような場合、水温は上がっていないので途中で氷を補充する必要はないが、インキュベートの途中で水温が上がり氷が完全に溶けてしまうような場合は、氷が完全に溶ける前に氷を補充する。この時の氷の量も、水面 1 cmを超えないように注意する。

断片化クロマチンの希釈

対応する Instruction Manual
(英語版 version 1、日本語訳 1.01版)
の項目番号 : 7. 8.

[断片化クロマチンを P.I. - ChIP Buffer 1× で希釈する。]



使用するチューブ(1.5 ml 及び 15 ml) を、氷上(又はアイスブロック)で冷やしておく。



断片化クロマチンを P.I. - ChIP Buffer 1× で希釈(断片化クロマチン 60 μ l に対して、P.I. - ChIP buffer 1× を 220 μ l 添加)し、5秒間ボルテックスした後、氷冷した 1.5 ml チューブに 280 μ l ずつ分注する。

免疫セレクション

対応する Instruction Manual
(英語版 version 1、日本語訳 1.01版)
の項目番号 : 10. 11.

[抗体を添加し、超音波ウォーターバスでインキュベートする。]



抗体を添加し、5秒間ボルテックスする。
添加する抗体の量は抗体に依存する。

ヒストン抗体の場合 : 1~2 μg /IP
その他のターゲット : 最大で 10 μg



超音波ウォーターバスで30分間、4 で、インキュベートする。

(インキュベートの間に行う) ビーズの準備 (Antibody binding beads の洗浄) 1/2

対応する Instruction Manual
(英語版 version 1、日本語訳 1.01版)
の項目番号 : 12. 13. 14. 15. 16.

[免疫セレクションの30分間のインキュベートの間に、Antibody binding beadsを洗浄する。]



20 IP分の場合

先をカットしたピペットチップで均一にサスペンドした Antibody binding beads 840 μ l を15 ml チューブに移し、ChIP buffer 1 \times 10.5 ml を添加し、2回転倒混和する。



遠心(3分間、500 \times g、4)し、アスピレーターで上清を除く。
(遠心している間に、次の (項目番号18.) に使用する1.5 ml チューブを準備する。)

(インキュベートの間に行う) ビーズの準備 (Antibody binding beads の洗浄) 2/2

対応する Instruction Manual
(英語版 version 1、日本語訳 1.01版)
の項目番号 : 17. 18. 19. 20. 21.



ビーズの沈殿に ChIP Buffer 1×10.5 ml を添加し、均一にサスペンドしながら、1.5 ml チューブ(で準備)に 0.5 ml ずつ分注する。



遠心(2分間、 $500 \times g$ 、4)し、各チューブに等量のビーズが入っていることを確認してから、アスピレーターで上清を除く。
洗浄したAntibody binding beadsは、次の (項目番号25.)で使用するまで氷上(又はアイスブロック)に置いておく。

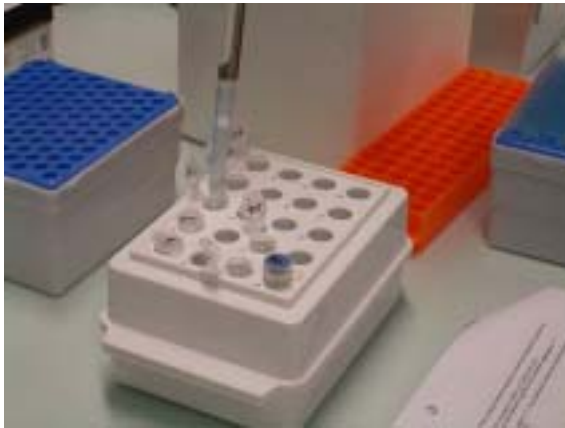
免疫沈降

対応する Instruction Manual
(英語版 version 1、日本語訳 1.01版)
の項目番号 : 22. 23. 24. 25. 26.

[インキュベートが終わったら、遠心して非特異的なアグリゲートを除き、ビーズを添加して免疫沈降を行う。]



免疫セレクションの30分間のインキュベーションが終わったら、超音波ウォーターバスからチューブを取り出し、遠心(10分間、 $14,000 \times g$ 、4)して非特異的なアグリゲートを除く。



上清 250 μ l (250 μ l 以上はとらない。)を、洗浄したAntibody binding beadsの入ったチューブに移し、[抗体-クロマチン-ビーズ] 混合液を、ローテーターで30分間、4 で、インキュベートする。
(インキュベート時間は1時間まで延長可。)

(インキュベートの間に行う) インプットサンプルの調製

[免疫沈降の30分間のインキュベートの間に、インプットサンプルを調製する。]



断片化クロマチン 6 μ l に、100 % エタノール 30 μ l を添加し、氷上で10分間インキュベートする。



遠心(10分間、10,000 \times g、4)し、上清を除く。

この免疫沈降のインキュベートの間に、
後の (項目番号45.) (ビーズの洗浄)
で使用する1.5 ml チューブを準備する。
ラベルした 1.5 ml チューブを冷やしておく。



沈殿に75 % エタノール 50 μ l を添加し、遠心(10分間、10,000 \times g、4)し、上清を除く。

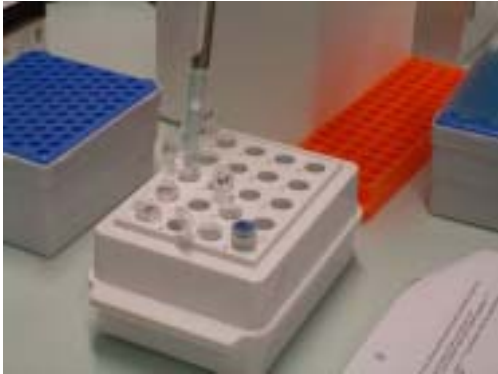


風乾する。

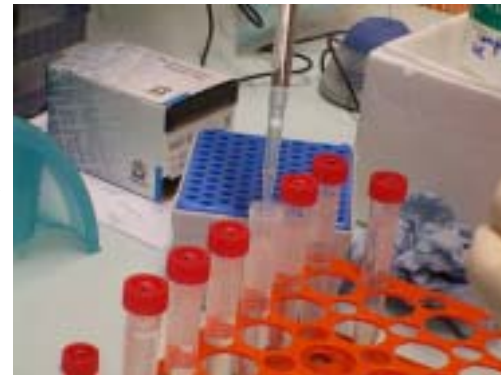
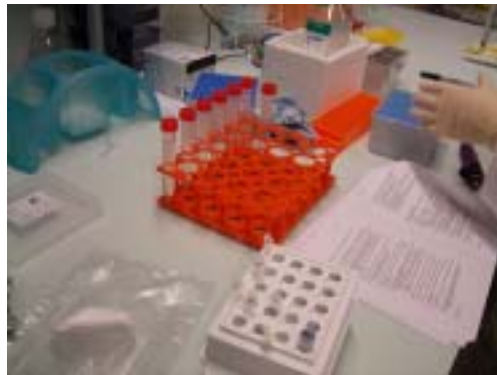
ビーズの洗浄 1/3

対応する Instruction Manual
(英語版 version 1、日本語訳 1.01版)
の項目番号 : 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40.

[インキュベートが終わったら、ビーズを洗浄する。]



免疫沈降の30分間のインキュベートが終わったら、[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。各チューブに氷冷した ChIP buffer 1 × 1 ml を添加し、2回転倒混和した後、遠心(2分間、500 × g、4)し、アスピレーターで上清を除く。



ビーズの沈殿に、氷冷した ChIP buffer 1 × 1 ml を添加し、2回ピペティングしてサスペンドした後、冷たい ChIP buffer 1 × 12 ml の入ったチューブにポタポタと滴下する。

ビーズの洗浄 2/3

対応する Instruction Manual
(英語版 version 1、日本語訳 1.01版)
の項目番号 : 41. 42. 43. 44.



4 の遠心機(低温室でも可)で5分間インキュベートした後、遠心(3分間、 $500 \times g$ 、4)する。



各チューブ 約 1 ml のバッファーを残して、アスピレーターで 約 12 ml のバッファーを吸いとる。

ビーズの洗浄 3/3

対応する Instruction Manual
(英語版 version 1、日本語訳 1.01版)
の項目番号 : 45. 46. 47. 48. 49.

<ビーズをキレイに吸いとるコツ>

ピペットチップの先端をチューブの底にあて、チップの先で小さな円を描くように、ピペットをクルクルと動かしながら吸いとる。

こうすると、チューブ壁にビーズが残りにくい。



[バッファー + ビーズ] を 1.5 ml チューブ(で準備)に移す。



遠心(2分間、500×g、4)し、アスピレーターで上清を除く。

蓋を開けて室温に放置する。

DNA精製（準備）

対応する Instruction Manual
(英語版 version 1、日本語訳 1.01版)
の項目番号： 50. 51. 58.

[これ以降の操作は、4 で行う必要はない。]



沸とう浴槽を準備する。
(DNA purifying slurry処理、Proteinase Kの失活に使用)



サーモミキサーを 55 にセットする。
(Proteinase K 処理に使用)



免疫沈降のインキュベートの間に調整し、
風乾していたインプットサンプルの沈殿に、
100 μ l の水を添加し、ピペティングで
均一にサスペンドする。

DNA 精製 (DNA purifying slurry 処理)

対応する Instruction Manual
(英語版 version 1、日本語訳 1.01版)
の項目番号 : [52](#) [53](#) [54](#) [55](#) [56](#) [57](#) [59](#).

[これ以降の操作は、インプットサンプルとChIPサンプルと一緒に行う。]



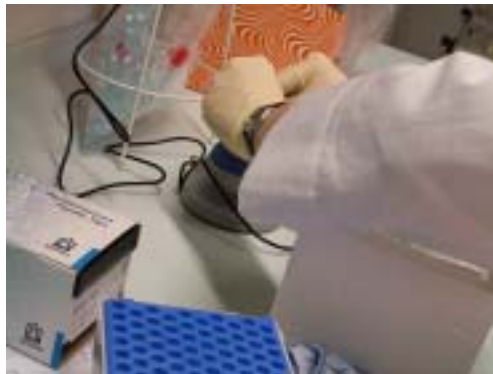
インプットサンプル



ChIPサンプル
(ビーズの沈殿)



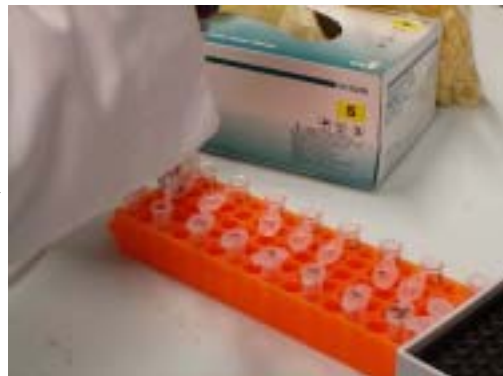
インプットサンプルとChIPサンプルのチューブに、DNA purifying slurry 100 μ l を添加する。
(DNA purifying slurryは、必ず懸濁した状態で行うこと。)



ボルテックス(又は転倒混和)した後、沸とう浴で10分間ボイルする。
ボイルしている間に、Proteinase Kを氷上でとかし、後の (項目番号71.) で使用する1.5 ml
チューブを準備する。

DNA精製 (Proteinase K 処理)

対応する Instruction Manual
(英語版 version 1、日本語訳 1.01版)
の項目番号 : 61. 62. 63. 64. 65. 68. 69.



沸とう浴からサンプルを取り出し、サンプルを冷ます(実験台の上にチューブを広げると冷めやすい)。
サンプルが冷めたら、各サンプルにProteinase K を 1 μ l ずつ添加し、2秒間ボルテックスする。



55 のサーモミキサーで、1,000 rpmで、30分間インキュベートし、インキュベートが終わったら、
Proteinase K を失活させるために、沸とう浴で10分間ボイルする。
沸とう浴からサンプルを取り出し、冷ます(実験台の上にサンプルを広げると冷めやすい)。

DNA精製 (回収)

対応する Instruction Manual
(英語版 version 1、日本語訳 1.01版)
の項目番号 : 70. 71. 72. 73. 74. 75.



遠心(1分間、 $14,000 \times g$ 、4)し、上清 70 μl を準備した 1.5 ml チューブ(で準備)に回収する。



沈殿に 130 μl の PCR-grade H₂O を添加し、10秒間ボルテックスする。

PCR用DNA
(200 μl)
定量PCRへ



遠心(1分間、 $14,000 \times g$ 、4)し、上清 130 μl を、1回目の遠心で回収した上清 70 μl の入ったチューブに回収する。