

クロマチン免疫沈降キット  
**Orange ChIP Kit**™

NIPPON GENE Code No. 317-80621  
( Diagenode Catalog #: kch-orgHIS-012 )

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

このマニュアルは、Diagenode 社の Orange 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		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ルの概要	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	8
	ステップ 1 - 細胞の固定と回収	9
	ステップ 2 - 細胞の溶解とクロマチン断片化	11
	ステップ 3 - 免疫セレクションと免疫沈降	12
	ステップ 4 - DNA 精製	14
	ステップ 5 - 定量 PCR	15
	解析ステップ- 断片化クロマチンの解析	18
	Orange ChIP Kit を使った実験例	19
5.	トラブルシューティングガイド	21
	追記プロトコール	23
6.	参考資料	25
7.	お問い合わせ	25

## 1. はじめに

ゲノム上の異なる選択領域内での、異なる細胞におけるヒストン修飾の解析は、遺伝子の発現状態とエピジェネティックマークの正確な分布を結びつけるために重要です。

クロマチン免疫沈降 (ChIP) は、インタクト細胞の特定ゲノム領域に関連のある、ヒストン修飾を解析することのできる技術で<sup>(1)</sup>、エピジェネティックマークと内部遺伝子領域の、アクティブなコーディング領域やサイレントなコーディング領域を関連付けることに使われています。

ChIP のメインステップは、細胞の固定、クロマチンの断片化、免疫セクション、免疫沈降 (IP)、そして免疫沈降した DNA の解析です。

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、目的の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、特定の配列の存在について定量ポリメラーゼ連鎖反応 (定量 PCR) で解析されます。その沈降の中に特異的な配列が多くあるということは、目的のタンパク質がその 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-タンパク質相互作用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<sup>(2)</sup>。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。クロスリンクの後、クロマチンは免疫沈降 (IP) 用に均一な小断片に切断される必要があります。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。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、その工程は手間のかかる反応条件の最適化をいくつか必要としています。Diagenode では、ChIP 用に最適化された試薬と、シンプルなプロトコールのキットを提供しています。そして、それぞれのキットでは、用途に合わせて最適化したツールセットを提供しています。

Orange ChIP Kit では、ヒストン及びヒストン修飾研究のための ChIP 手順の有効性を高める ChIP メソッドを採用しています。断片化のプロトコールが短くなっており、主要ステップであるクロマチンサンプルの調製は、かなり短縮されています (“キットのモジュール及びプロトコール概要” 参照)。一方で、ヒストン-ChIP アッセイの特異性を高めるために、クロマチンのプレクリアステップが追加されました (“タイムテーブル” 及び “キットのアッセイプロトコール” 参照)。

さらに、Orange ChIP バッファーや洗浄バッファーのストリンジェンシー、洗浄ステップは、ヒストン-ChIP に適合しており、キットには、コントロール抗体や PCR プライマー対等のコントロールも含まれています。

## 2. キットの概要



Diagenode の Orange ChIP Kit は、 **クロマチン断片化モジュール**、 **抗体モジュール** (ヒストンの免疫セレクション)、 **ChIP モジュール**、 **定量 PCR モジュール** の 4 つのモジュールから構成されています。

そして、本キットには、細胞の回収から PCR まで、ChIP 解析 18 回分の試薬が入っており、ヒストン及びヒストン修飾解析を行うために至適化された、バッファーとプロトコールを提供しています。

### 3. キットの構成

#### キット内容

本キットには、細胞の回収から PCR まで、ChIP 解析 18 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
- セルスクレーパー（**ステップ 1-A** クロマチン断片化のためのスクレーピングメソッド）
- トリプシン-EDTA（**ステップ 1-B** 細胞をカウントするためのトリプシンメソッド）
- ホルムアルデヒド（37%(w/v)ストック溶液）\*
- 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
- リアルタイム PCR 試薬
- RNase（1 µg/µl）
- アガロースと TAE バッファー
- DNA 分子量マーカー

##### 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、catalog #UCD-200）\*\*
- ローテーター
- ボルテックスミキサー
- サーモシェーカー（65℃）
- 微量遠心機とローテーターのある低温室
- リアルタイム PCR 装置
- アガロースゲル電気泳動装置

\*：市販されているホルムアルデヒド液は通常約37%水溶液です。

\*\*：日本国内において、密閉式超音波細胞破碎装置 Bioruptor™ はコスモ・バイオ株式会社の取扱い製品です。Deagenode社のBioruptor™（catalog #UCD-200）は日本では販売していません。

## 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保存温度で保存してください。)

断片化モジュール (ステップ 1、2)			
内容	コメント	容量	保存
1.25 M glycine	-	10 ml	4
Buffer A (クロマチン断片化)	界面活性剤とイオンキレート剤ミックスが含まれます。	5 ml	4

抗体モジュール (ステップ 3)			
内容	コメント	容量	保存
Antibody anti-histone modification: H3K4me3	0.5 µg/µl; 0.01% のアジ化物が含まれます。	20 µl	-20

ChIP モジュール (ステップ 3、4)			
内容	コメント	容量	保存
Buffer B (5×ChIP)	塩とイオンキレート剤ミックスを含む、界面活性剤混合液です。	5 ml	4
Protease inhibitor mix (P.I.)	<i>Protease inhibitor mix</i> のタブレットを 400 µl の水に溶解し、-20 で保存してください。25×ストック溶液になります。	1 タブレット	-20
Pre-blocked protein A coated beads	18 IP 用の 1:2 懸濁液です。0.02% のアジ化物が含まれます。	880 µl	4 , 凍結厳禁
Wash buffer-1	塩とイオンキレート剤ミックスを含む界面活性剤混合液です。	10 ml	4
Wash buffer-2	塩とイオンキレート剤ミックスを含む界面活性剤混合液です。	20 ml	4
Wash buffer-3	イオンキレート剤ミックスが含まれます。	20 ml	4
Buffer C (溶出)	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。	10 ml	4
5 M NaCl	-	400 µl	4
DNA co-precipitant	-	100 µl	-20
DNA precipitant	-	1000 µl	4
H <sub>2</sub> O	-	10 ml	4

定量 PCR モジュール (ステップ 5)			
内容	コメント	容量	保存
c-fos promoter primer pair	5 µM each (リバーズ & フォワードプライマー)	50 µl	-20
b-actin promoter primer pair	5 µM each (リバーズ & フォワードプライマー)	50 µl	-20
Myoglobin exon 2 primer pair	5 µM each (リバーズ & フォワードプライマー)	50 µl	-20
BMX primer pair	5 µM each (リバーズ & フォワードプライマー)	50 µl	-20

## キットのモジュールとプロトコールの概要

表 2

モジュール		日程	所要時間
<b>断片化モジュール</b>			
ステップ 1-	細胞の固定と回収	1 日目	30 分間
ステップ 2-	細胞溶解とクロマチン断片化	1 日目	20 分間
<b>抗体 &amp; ChIP モジュール</b>			
ステップ 3-	プレクリア	1 日目	75 分間
	免疫セレクション	1 日目	15 分間 + 一晚
	免疫沈降	2 日目	1 時間
	ビーズ洗浄	2 日目	1.5 時間
ステップ 4-	DNA 精製	2 日目	5 時間
<b>定量 PCR モジュール</b>			
ステップ 5-	DNA 精製と定量 PCR	3 日目	4 時間

<b>断片化クロマチンの解析</b>		
解析ステップ 1.~3.	2 日目	ステップ 4 (4.~9.) と同様
解析ステップ 4.~5.	3 日目	ステップ 4 (10.~13.) と同様
解析ステップ 6.~7.	3 日目	2 時間
解析ステップ 1.~2.を 1 日目 (10 分間+一晚) に、解析ステップ 3.~7.を 2 日目 (3 時間) に行うこともできます。		

## 4. キットのアクセイブプロトコール

### Orange ChIP : ヒストン-クロマチン免疫沈降の進め方

----- 1 日目 -----

#### スターティングマテリアル - 培養細胞

細胞がコンフルエントに達したら、以下のプロトコールを開始する。

- ❖コンフルエントまで増殖したヒト骨肉腫 U2OS 細胞の場合、140 mm ディッシュあたり  $10^7$  細胞となる。他の細胞系では、15 cm ディッシュあたり、少なくとも  $3 \times 10^6$  の細胞が得られる。以下のプロトコールは  $1 \times 10^7$  細胞用である (ステップ 1-A)。キットには、約  $4 \times 10^7$  細胞分のクロマチン調製用バッファーが入っている。
- ❖インダクションした細胞や処理した細胞も、未処理の細胞と同様に調製し、ChIP 研究用に用いることができる。
- ❖断片化クロマチンのほとんどは ChIP 実験で使用されるが、一部はコントロールとして必要である。  
ChIP 実験用の input サンプルとして (ステップ 4- 及び 5-) 断片化効率の確認のため (解析ステップ)

各 ChIP 解析には、 $10^5$  細胞が必要とされる。スケールは適当に調整する。

表 3

クロマチンの調製	必要な細胞数	Buffer A の容量
1 ヒストン - ChIP	$1.25 \times 10^5$	10 $\mu$ l
6 ヒストン - ChIP	$7.5 \times 10^5$	60 $\mu$ l
12 ヒストン - ChIP	$1.5 \times 10^6$	120 $\mu$ l
18 ヒストン - ChIP	$2.25 \times 10^6$	180 $\mu$ l

- ❖ ステップ 1-A 7. (上の表 3 に書かれているように、細胞を懸濁する。)
- ❖ ステップ 2- 1. ~6. (クロマチン断片化)
- ❖ ステップ 3- 3. (ChIP)

## ステップ 1 - 細胞の固定と回収

以下のプロトコールは、 $10^7$  細胞の入っている 140 mm ディッシュのためのものである（ステップ 1-A）。それ以上の細胞で操作する場合は、スケールを適当に調整する。細胞数のカウント用に、ディッシュを 1 枚キープする（ステップ 1-B）。

### ステップ 1-A：ヒストン-ChIP のためのスクレーピングメソッド（推奨）

1. 終濃度 1% ホルムアルデヒドとなるように、37% (w/v) ホルムアルデヒドを、フラスコの中の培養細胞の培地に直接添加し、すばやく混ぜる。
  - ❖ 24 ml の培地に、0.65 ml の 37% ホルムアルデヒド添加する。
  - ❖ ヒストン-ChIP 用のクロマチンを調製する際は、これより高濃度のホルムアルデヒドで固定する必要はない。
2. 振とう台の上で、室温で 10 分間、穏やかにインキュベートする。
  - ❖ ヒストン-ChIP 用のクロマチンを調製する際は、これより長時間固定する必要はない。
3. 終濃度 125 mM glycine となるように、1/10 倍量の 1.25 M glycine を培地に添加し、混ぜる。（クロスリンク反応を停止するために添加する。）
  - ❖ 細胞（25 ml の [ホルムアルデヒド- 培地] 混合液）に 2.5 ml の 1.25 M glycine を添加する。
4. プレートから培地を除く。
5. 10 ml の氷冷した  $1 \times$  PBS で細胞を 2 回洗浄する。2 回目の洗浄後、すべての PBS をアスピレート（吸引）する。
6. 500  $\mu$ l の Buffer A をプレートに添加し、スクレーピング（かきとり）で細胞を集め、15 ml チューブに移す。
  - ❖ 約  $10^7$  細胞のペレットが、500  $\mu$ l に懸濁される。固定した細胞数に合わせて、スケールは調整する。
7. 細胞懸濁液の終濃度は、800  $\mu$ l の Buffer A に対して  $10^7$  細胞とする。必要であれば、さらにバッファを添加する。
  - ❖ ステップ 1-B は細胞をカウントするためのプロトコールである（下記参照）。
  - ❖ 例えば、6. で  $10^7$  細胞をバッファに懸濁した場合、[細胞-バッファ] 混合液のトータル量が 800  $\mu$ l になるように、さらにバッファを添加する。
  - ❖ 固定した細胞数に合わせて、スケールは調整する。例えば、2 枚のプレートを使って  $2.5 \times 10^7$  細胞を培養した場合は、2 ml の Buffer A に懸濁する。
8. これが断片化用のクロマチンを含むサンプルである。ステップ 2 へ進む。

## ステップ 1-B : 細胞をカウントするためのトリプシンメソッド

1. 1×PBS、培地、トリプシン-EDTA を温めておく。
2. 古い培地を取り除き、温めておいた 1×PBS で細胞をリンスする（使用量については表 4 参照）。ディッシュを 2 分間振とうし、その後で PBS を取り除く。

表 4

細胞のリンス	3 × 10 <sup>6</sup> 細胞	1 × 10 <sup>7</sup> 細胞
1 × PBS	3.5 ml	10 ml

3. トリプシン-EDTA を接着細胞を含むフラスコ又はディッシュに添加する（使用量については表 5 参照）。短時間のトリプシン-EDTA 処理で、フラスコの底から接着細胞を剥がす。
  - ❖ 接着の程度はそれぞれの細胞系によって異なり、それに付随する知見で示されている。必要であれば、フラスコを 1~2 分間程度インキュベーターへ戻す。

表 5

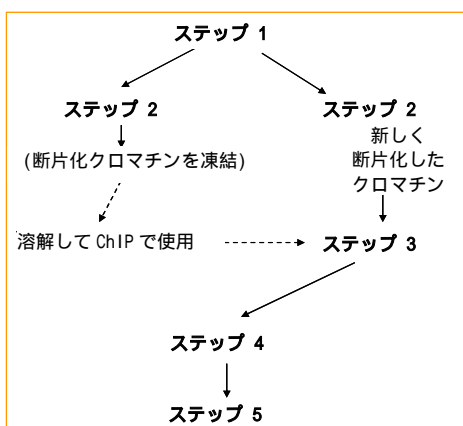
細胞の分離	3 × 10 <sup>6</sup> 細胞	1 × 10 <sup>7</sup> 細胞
トリプシン-EDTA	1 ml	3 ml

4. 1 分後、細胞がフラスコの底から取れたかどうかを目で確認する。
  - ❖ 長時間のトリプシン処理は細胞を傷つける可能性がある。シート状の浮いている細胞が肉眼で観察できる。
5. 細胞が剥がれたら、すばやく培地を細胞に添加する（表 6 参照）。培地の添加はトリプシンを不活性化する。

表 6

トリプシンの中和	3 × 10 <sup>6</sup> 細胞	1 × 10 <sup>7</sup> 細胞
培地	2 ml	6 ml

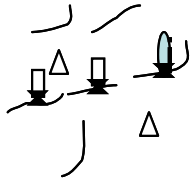
6. [細胞-培地]混合液で培養フラスコの側面を洗い流す。ピペットで細胞を取り、15 ml 又は 50 ml の遠心チューブに移す。
7. 細胞をカウントする。



断片化クロマチンを新しく調製し、それらを直接 ChIP（ステップ 3）で使用するのがベストであるが、断片化クロマチンを凍結し（ステップ 2-6. でストップ）、他の日に ChIP を実施することも可能である。

## ステップ 2 - 細胞の溶解とクロマチンの断片化

細胞膜と核膜の破碎と、クロスリンクしたクロマチンファイバーの断片化のために、超音波処理が使われる。ChIPの結果に与える影響が大きいので、適正な長さのクロマチン断片を生成することは重要である。



❖ このプロトコールは、多様な哺乳動物細胞で良好な結果が得られている。しかし、特殊な細胞タイプの場合は、断片化条件や固定プロトコールを至適化した方がよいかもしれない。したがって、少量のサンプル ( $3 \times 10^6$  細胞) から始めることや、断片化の効率をチェックすることを推奨する。

❖ **ステップ 2** と**解析ステップ**にしたがって使用する。使用する細胞に対する条件を至的化したら、ChIP用の断片化クロマチンを調製し、**ステップ 3** と**ステップ 4** に進む。

1. クロマチンを含むサンプルを適当なチューブに移す。 :
    - 1.5 ml チューブに 300  $\mu$ l 以上入れない。
    - 15 ml チューブに 2 ml 以上入れない。
    - ❖ 10  $\mu$ l の断片化クロマチンは  $10^5$  細胞分に相当する (**ステップ 1-A**)。
    - ❖ 断片化していないクロマチンをコントロールとしてキープする (**解析ステップ**)。
  2. DiagenodeのBioruptor™ (catalog # UCD-200) を使って、クロマチンのサンプルを断片化する。サンプル温度は 0 近くに保ち、各サンプル[30 秒間 “ON” /30 秒間 “OFF” ]で、10 サイクル超音波破碎する。トータル時間は 10 分間である。
    - ❖ 上記の断片化条件は多くの哺乳動物細胞でテストされ、その後の ChIP 実験の結果も良好であった。
    - ❖ このクロマチンの断片化の結果、平均 200-600 bp のサイズの DNA 断片が生じる。
    - ❖ 至的な断片化条件は ChIP 効率に重要である。断片化条件は、各細胞タイプや、固定プロトコール、超音波破碎装置に対して、至的化されるべきである。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が利用できる。
  3. 断片化の後、15 ml チューブを使用している場合は、2 ml チューブに移す。
  4. 残渣を除くため、遠心 (5 分間、 $14,000 \times g$  (13,000 rpm)、室温) し、上清をキープする。これが断片化クロマチンサンプルである。
  5. コントロールとして 1.5 ml チューブに断片化クロマチンを分注する。10  $\mu$ l の断片化クロマチンは約  $10^5$  細胞分に相当する。
    - ❖ 断片化クロマチンの品質を解析するため、本マニュアルのプロトコールにしたがう (**解析ステップ**)。
  6. 断片化クロマチンは、そのまま ChIP に使用する (**ステップ 3-3.**)。
    - ❖ 断片化クロマチンの一部は、input サンプルとして使用される (**ステップ 3-3.**)。
    - ❖ ChIP サンプルと input サンプルからの DNA の単離は、並行して行う (**ステップ 4-3.以降**)。
- 75  $\mu$ l 又は 150  $\mu$ l の断片化クロマチンを冷凍チューブに分注し、液体窒素で瞬間凍結して -80 で保存することもできる。
- ❖ ChIP のターゲットにもよるが、数ヶ月間又は数週間、クロマチンを液体窒素で保存することができる。

- ❖ 凍結した断片化クロマチンを ChIP に使用することもできるが、新しいクロマチンを使う方がベストである。1、2ヶ月以上古い場合（-80 保存）、品質は低下する。
- ❖ H3K27me3 のようないくつかのヒストン修飾においては、クロマチンサンプルを ChIP buffer 1×で一晩透析することが要求されるかもしれない。
- ❖ 凍結融解はしない。
- ❖ 10 μl の断片化クロマチンは 10<sup>5</sup> 細胞分に相当する（ステップ 1-A）。
- ❖ 1 IP あたり 10 μl の断片化クロマチンを使用する（ステップ 3-3.）。
- ❖ 75 μl の断片化クロマチンサンプルは 6 IP 用である。
- ❖ 150 μl の断片化クロマチンは 12 IP 用である。

### ステップ 3 – 免疫セクションと免疫沈降

ChIP モジュール

はじめに、ポジティブ及びネガティブコントロールも含め、ChIP を行うサンプル数を決める。

#### プレクリアと免疫セクション

断片化クロマチンのサンプルをプレクリアし、下記のように抗ヒストン抗体とインキュベートする。

1. P.I. mix、Buffer B、水を混合し、IP インキュベーションミックスを準備する。

表 7

ChIP	IP インキュベーションミックスに含まれる容量：		
	P.I.	Buffer B (5×ChIP)	H <sub>2</sub> O
1	4 μl	20 μl	76 μl

- ❖ P.I. : protease inhibitor mix (P.I.) のタブレットを 400 μl の水に溶かすと、25× のストック溶液になる。使用後は、分注して -20 で保存する（最低 4 ヶ月間は安定である）。
2. 90 μl の新しく調製した IP インキュベーションミックスを、1.5 ml チューブに入れる。
    - ❖ 1 ChIP アッセイに 1 チューブ使用する。本プロトコールではこれを IP チューブとする。
  3. 1 IP チューブあたり、10 μl の断片化クロマチンを添加する（ステップ 2-6. より）。また、input サンプル（ステップ 4-3.）として、10 μl の希釈したクロマチンをキープする。
    - ❖ コントロールの IP チューブを含む。
    - ❖ 10 μl の断片化クロマチンは 10<sup>5</sup> 細胞分に相当する（ステップ 1-A）。
    - ❖ この段階で、断片化クロマチンは 10 倍に希釈される。
    - ❖ 断片化クロマチンの input サンプルは、1 ChIP に使われる量の 10% 分である。ステップ 4-3. から ChIP サンプルと一緒に操作するようになるまで、-20 で保存する。
  4. 20 μl の pre-blocked beads を希釈したクロマチンに添加し、ローテーターで 60 分間、4 でインキュベートする。これが断片化クロマチンサンプルのプレクリアである。
  5. 遠心（2 分間、500 × g（2,500 ~ 3,000 rpm）、4 ）し、上清をキープする。

6. 100  $\mu$ l の上清を、新しい IP チューブに移す。
  - ❖ 1 IP あたり 100  $\mu$ l のプレクリアした断片化クロマチンが必要とされる。
  - ❖ ビーズは捨てる。
7. 最後に、IP チューブに、目的の抗ヒストン抗体を添加する。 :
  - キットに入っている antibody anti-histone H3[K4me3] : 1 IP あたり 0.5  $\mu$ g (1  $\mu$ l) を使用。
  - その他の抗体 : 0.5~2  $\mu$ g を使用 (容量は使用する抗体に依存)。
  - ❖ 次のようなコントロールを含む :
    - “ネガティブコントロール IgG”、“抗体無添加”、“クロマチン無添加”、“ポジティブコントロール抗体”...
  - ❖ また、異なる細胞タイプの断片化クロマチンや、異なるインダクションや処理を受けた細胞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。
8. 数回転倒混和し、ローテーターで一晩、4 でインキュベートする。

## ----- 2 日目 -----

### 免疫沈降

ChIP モジュール



このステップは、下記に記載したように、pre-blocked antibody binding beads (1:2 懸濁液) を [抗体-クロマチン] ミックスに添加することから構成される。

9. 使用する前に、キットに入っている pre-blocked beads を均一な懸濁液になるようにサスペンドする。
10. 各 IP チューブに 20  $\mu$ l を添加する。
11. ローテーターで 1 時間、4 でインキュベートする。

### ビーズの洗浄

ビーズについている [抗体-クロマチン] コンプレックスを、下記のように洗浄する。

12. インキュベートの後、遠心 (2 分間、500  $\times$  g (2,500~3,000 rpm)、4 ) して、ビーズを沈殿させ、上清を静かに除く。
  - ❖ ビーズを動かさないように注意する。
  - ❖ ビーズは、ビーズに結合している [クロマチン-抗体] コンプレックスを単離するために洗浄される。
  - ❖ サンプルは低温に保つ。洗浄ステップを低温室で行うことを強く推奨する。
  - ❖ Buffer C を室温に置く。
13. 次のようにしてビーズの洗浄を進める。400  $\mu$ l の氷冷した Wash buffer を IP チューブに添加し、ローテーターで 5 分間、4 でインキュベートする。遠心 (2 分間、500  $\times$  g (2,500~3,000 rpm)、4 ) してビーズを沈殿させ、静かに上清を除く。以下の洗浄用バッファーを使って、上記の洗浄操作を繰り返す。

- wash buffer-1 で、洗浄 1 回
- wash buffer-2 で、洗浄 2 回
- wash buffer-3 で、洗浄 2 回

❖ 各洗浄ステップの後は、沈殿を乱さずに、できるだけ多くのバッファーを取り除くようにする。最後の洗浄の後は、バッファーを最後まで慎重に取り除く。

## ステップ 4 - DNA 精製

ChIP モジュール

最終ステップは、ビーズに結合している[抗体-クロマチン]コンプレックスから DNA を溶出させることである (ChIP サンプル)。免疫沈降したクロマチンから DNA を単離した後、DNA は精製される。

1. 400  $\mu$ l の Buffer C (あらかじめ室温に置いておいた溶出バッファー) をビーズの沈殿に添加し、ローテーターで 20 分間、室温でインキュベートして、ビーズに結合している [DNA-ヒストン-抗体]コンプレックスを溶出する。
2. 遠心 (2 分間、500  $\times$ g (2,500 ~ 3,000 rpm)、室温) して、ビーズを沈殿させ、上清を新しい 1.5 ml チューブに移す。これが免疫沈降で単離され、ビーズから溶出された DNA に相当する。
  - ❖ ChIP サンプルの数だけ IP チューブがある。
3. 390  $\mu$ l の Buffer C (室温の溶出バッファー) を 10  $\mu$ l の希釈したクロマチンサンプル (ステップ 3-3. から) に添加し、最終容量を 400  $\mu$ l とする。これが input サンプルに相当する。
  - ❖ ここからは、ChIP サンプルと input サンプルを一緒に処理する。
  - ❖ ステップ 3-3. の新しい又は溶かした断片化クロマチンを使用する。
  - ❖ Input サンプルのクロマチンは、各 ChIP に使っているクロマチンの 10% の量である。

### ChIP サンプル及び input サンプルからの DNA の回収と精製 :

4. 16  $\mu$ l の 5 M NaCl を添加し、混合して、サーモシェーカーで 4 時間、65  $^{\circ}$ C でインキュベートし、クロスリンクを解除する (脱クロスリンク)。
  - ❖ クロスリンクの解除をオーバーナイトで行うことも可能である。
5. 室温に冷まし、400  $\mu$ l 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) を添加し、激しく 5 秒間ボルテックスする。
  - ❖ 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可能である。
6. 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。
7. 400  $\mu$ l のクロロホルム/イソアミルアルコール (24 : 1) を添加し、激しく 5 秒間ボルテックスする。
  - ❖ 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可能である。

8. 遠心 (2 分間、14,000 × 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。
9. 1 チューブあたり、5 μl の DNA co-precipitant と、40 μl の DNA precipitant を添加する。1 ml の氷冷したエタノールを添加し、よく混ぜ、-20 に一晩置く。
  - ❖ -20 でのサンプルのインキュベートは 30 分間でも可。その場合は、そのまま下記の **ステップ 4-10** に進む。

----- 3 日目 -----

10. 遠心 (25 分間、14,000 × g (13,000 rpm)、4 ) する。慎重に上清を除き、沈殿に 500 μl の氷冷した 70% エタノールを添加する。
11. 遠心 (10 分間、14,000 × g (13,000 rpm)、4 ) する。慎重に上清を除き、蓋を開けて室温で 30 分間放置し、残っているエタノールを蒸発させる。沈殿は、断片化クロマチンから精製された DNA (input サンプル)、ChIP で単離された DNA (ChIP サンプル) である。
  - ❖ チューブ壁にエタノールが残らないようにする。
  - ❖ Input サンプルとして使用した断片化クロマチンは、ChIP アッセイで使用した断片化クロマチンと同時に調製したものに相当するものでなければならない。
12. 50 μl の水を ChIP サンプルに添加する。input サンプルにも 50 μl の水を添加する。
13. チューブをシェーカーに置き、14,000 × g (13,000 rpm) で 30 分間、室温でインキュベートし、沈殿を溶かす。
  - ❖ DNA を均一にサスペンドするために振とうする。
  - ❖ インキュベートしている間に、PCR ミックスを準備する。

## ステップ 5 - 定量 PCR

定量 PCR モジュール



- ❖ クロマチン免疫沈降では、特異的なプライマーを使った定量 PCR で増幅できる微量な DNA が得られる。PCR サイクルの間に生成された二本鎖 DNA の量は、SYBR Green のようなインターカレート色素の蛍光により定量される。
- ❖ 信頼性の高い定量結果を得るためには、慎重に取りかかるべきいくつかの基準がある。下記の「定量 PCR 備考」を参照する。

1. 定量 PCR バッファーマックスを氷上で溶かす。
2. 定量 PCR バッファーマックスに水を加える。1 PCR サンプルあたり : 5.5 μl の水を 12.5 μl のバッファーマックスに加え、10 秒間ボルテックスする。
  - ❖ バッファーマックスは、IQ SYBR Green supermix や研究室で使用しているその他のメーカーのものが使えるが、その場合は試薬メーカーの指示に従う。
3. 1 PCR サンプルあたり : 2 μl の primer pair セットを添加する。

- ❖ 定量 PCR モジュールのプライマーは、フォワード (FW) とリバース (RV) の両方を含む混合液として提供される。終濃度は各 5  $\mu\text{M}$  である。
4. input DNA (ステップ 4-13. で調製) を水で 1 : 10 に希釈したものを調製する。ボルテックスで 5 秒間混ぜる。
    - ❖ 希釈した input DNA サンプルは、終濃度 20 細胞/ $\mu\text{l}$  の input DNA に相当する。
  5. 1 PCR サンプルあたり : 5  $\mu\text{l}$  の DNA サンプルを添加する。
    - ChIP から (ステップ 4-13. で調製)
    - input から (ステップ 5-4. で調製した 1:10 希釈)

表 8

1 PCR サンプルあたり			
定量 PCR バッファーミックス	水	primer pair	DNA
12.5 $\mu\text{l}$	5.5 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$

- ❖ input サンプルの DNA は、1 ChIP で使用する 1%の量 (細胞数) に相当する。

6. 下表に示した条件 (サイクルと温度) で PCR を行う (“結果” の図 1 及び 2 参照)。

表 9

	温度	Time	サイクル
PCR 増幅	95	3 分間	$\times 1$
	95	15 秒間	$\times 40$
	60	45 秒間	
	95	1 分間	$\times 1$
融解曲線	65 で 1 サイクルにつき 0.5 づつ上昇	1 分間	$\times 60$

- ❖ Orange ChIP Kit に入っている全ての primer pair は、これらの至適化された条件で使用することを強く推奨する。
- ❖ primer pairs は、c-fos 及び b-actin プロモーター領域、BMX (骨髄非受容体型チロシンキナーゼ、txn の 18 kb 下流)、Myoglobin exon 2 をターゲットとしている。
- ❖ 二本鎖 DNA にはそれぞれ固有の特異的な融解温度 ( $T_m$ ) があり、それは 50% の DNA が一本鎖になる温度と定義されている。そして、標識プローブとアンプリコンの 1 つのミスマッチでさえ融解温度を有意に減少させる。融解曲線を見ることで、目的のアンプリコンが検出されていることを確認する。

#### ❖ 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](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、アニーリング温度は 60 を推奨する。
- \_ 短い DNA 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が、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。

#### ❖ 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。

\_ input 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、次の式を使ってプライマーセットの増幅効率(AE)を算出する<sup>(3)</sup>。

$$AE = 10^{-1/\text{傾き}}$$

\_ 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るべきである。

## 7. 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。

### ❖ バックグラウンドの決定

ChIPの最終目的は、同一ChIPサンプルにおける、特異的なDNA断片(目的のタンパク質の結合部位に相当するもの)と、関連性のないゲノム領域(バックグラウンド)の、多さを算定することである。

バックグラウンドのゲノム領域は、目的のタンパク質の結合部位から離れたところ(最低でも数千bp)に位置する方がよい。核クロマチンの複合体構造を考えると、適切なバックグラウンドのレベルを確認するために、ゲノム上の異なる部分にあるいくつかの遺伝子をテストすることを推奨する。本キットでは、その遺伝子が組織に特異的で、ほとんどの細胞系で転写的にサイレントであることから、バックグラウンド領域としてミオグロビンのエキソン2を選択している。

### ❖ データの解釈

ゲノム上の特定の遺伝子座の免疫沈降の効率は、スターティングマテリアルのパーセンテージ(% input, recovery)として定量PCRのデータから計算することができる。

$$\% \text{ input} = AE^{(Ct_{\text{input}} - Ct_{\text{ChIP}})} \times F_d \times 100\%$$

このAEは先に計算した増幅効率<sup>(3)</sup>、 $Ct_{\text{ChIP}}$ と $Ct_{\text{input}}$ は定量PCRの指数増幅段階から得られたthreshold値、 $F_d$ は定量PCRに使ったChIPとinputのDNAの量の差のバランスをとるための希釈補正ファクターである。

❖ *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は特定の遺伝子座とタンパク質の結合の尺度として使われ、ChIPの特異性についての手がかりとなる。特異性の高いChIPでは、バックグラウンドより約10倍高い結果となり、中には1,000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。

### ❖ もうひとつの方法

免疫沈降された遺伝子座の遺伝因子のRelative occupancyは次式を使っても計算できる。

$$\text{Relative occupancy} = 2^{(Ct_{\text{NegChIP}} - Ct_{\text{Target}})}$$

$Ct_{\text{NegChIP}}$ と $Ct_{\text{Target}}$ は、定量PCRで得られた、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(特定の抗体を使用)のthreshold値を意味している<sup>(4)</sup>。

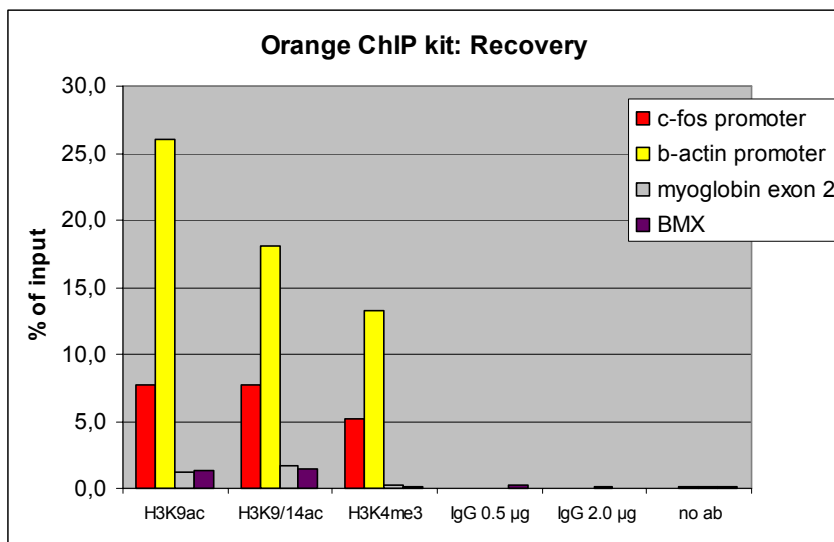
## 解析ステップ：断片化クロマチンの解析

断片化クロマチンの品質を解析したい場合は、下記のプロトコールで行う（“ルート 1”又は“ルート 2”）。

- ❖ ルート 1：解析ステップ 1.と2.を1日目に行い、解析ステップ 3.~7.を2日目に行う。
  - ❖ ルート 2：解析ステップ 1.~5.はChIP アッセイの2日目及び3日目に行われるステップ（ステップ 4-4.~13.）と同じである。そのため、input サンプルから調製した DNA を解析ステップ 6.及び7.でアガロースゲルで解析することができる。
1. 断片化クロマチンをアガロースゲルで解析するために、断片化クロマチンをとる（ステップ 2-5.から）。
    - ❖ 10  $\mu$ lの断片化クロマチンは約  $10^5$ 細胞分に相当する。
    - ❖ 断片化していないクロマチンもアガロースゲルで同様に解析する。
  2. Buffer C（あらかじめ温めておいた溶出バッファー）と5M NaClを添加し、サーモシーカーで4時間、65 でインキュベートし、クロスリンクを解除する（一晩インキュベートすることも可）。
  3. 室温に冷まし、フェノール/クロロホルムとクロロホルムで抽出する。co-precipitant と precipitant をサンプルに添加し、100% エタノールを添加して DNA を沈殿させる。-20 でインキュベートする（ステップ 4-5.~9.）。
  4. 沈殿を70%エタノールで洗浄し、風乾する（ステップ 4-10.及び11.）。
  5. 沈殿を水にサスペンドし、一部を新しいチューブにキープする（ステップ 5-12.~13.）。これが断片化クロマチンから精製した DNA に相当する。
    - ❖ 断片化クロマチンでChIPが実施された場合、このサンプルがステップ 4-13.で得られる input サンプルに相当する
    - ❖ DNA サンプルは4 で保存できる（長期の場合は-20 保存）。
  6. 20  $\mu$ lの DNA サンプルを RNase で次のように処理する。20  $\mu$ lの DNA に、2  $\mu$ lの RNase-DNase free（1  $\mu$ g/ $\mu$ lストック溶液）を添加し、30分間、37 でインキュベートする。
    - ❖ 新しく調製（上記5.）したものではなく、4 や-20 で保存していた20  $\mu$ lの DNA を使う場合は、6.に進む前に、サーモミキサーで10分間、65 でサンプルをインキュベートする。
  7. 断片化の効率を視覚化するために、サンプルを DNA 分子量マーカーと一緒に1% アガロースゲルで泳動して解析する。

## Orange ChIP Kit を使った実験例：

図1：ChIP recovery



### ヒストン-ChIP解析

#### DiagenodeのOrange ChIP Kitで得られたChIPの結果 (Recovery)

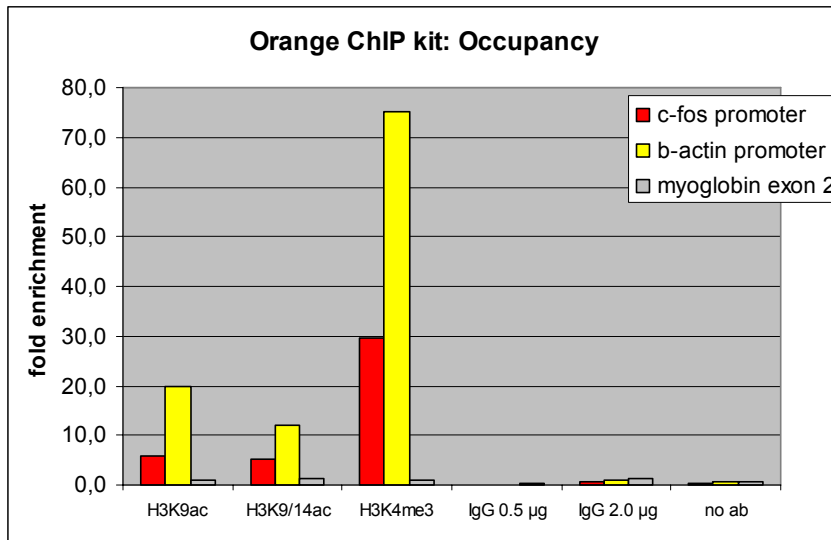
使用した細胞：ヒト骨肉腫 U2OS細胞

使用した抗体：抗修飾ヒストン抗体 (Diagenode)  
anti-histone H3 K9ac (2 µg/ChIP)  
anti-histone H3 K9/14ac (2 µg/ChIP)  
anti-histone H3 K4me3 (0.5 µg/ChIP)

PCRプライマー：本キットに入っている至適化されたPCRプライマー4種

ネガティブコントロール：  
ネガティブコントロールIgG (IgG 0.5 µg、IgG 2 µg)  
抗体無添加 (no ab)

図 2 : CHIP occupancy



## ヒストン-ChIP解析

### DiagenodeのOrange ChIP Kitで得られたChIPの結果 (Occupancy)

使用した細胞：ヒト骨肉腫 U2OS細胞

使用した抗体：抗修飾ヒストン抗体 (Diagenode)

anti-histone H3 K9ac (2 µg/ChIP)

anti-histone H3 K9/14ac (2 µg/ChIP)

anti-histone H3 K4me3 (0.5 µg/ChIP)

PCRプライマー：本キットに入っている至適化されたPCRプライマー4種

ネガティブコントロール：

ネガティブコントロールIgG (IgG 0.5 µg、IgG 2 µg)

抗体無添加 (no ab)

## 5. トラブルシューティングガイド

ステップ	トラブル、解決方法とコメント	
クロスリンク	クロスリンクが弱すぎる	10分間の固定ステップを、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。 高純度のホルムアルデヒドを使用する。
	クロスリンクが強すぎる	
	<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。ヒストンはDNAにしっかりと結合している。	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テ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。ヒストンの場合は、長いクロスリンクは必要ない。
細胞の溶解	細胞が完全に破碎されていない。	溶解バッファーの量に対して、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	1 ヒストン-ChIPに使う細胞の量は重要である。	1 ヒストン-ChIPあたり、 $10^6$ 細胞を使用することを推奨する。
クロマチンの断片化	バッファーの構成	キットに入っている至適化されたバッファーを使用する。サンプルは低温に保つ。
断片化したDNAの高品質電気泳動写真	DNA断片の正確なサイズ決定のために。	クロスリンクを解除(脱クロスリンク)し、フェノール/クロロホルム抽出の後でDNAを沈殿させる。
	クロスリンクサンプルのアガロースゲル電気泳動がスミアになる。	クロスリンクを外すことをすすめる。
	アガロースゲル上での多量のDNAの移動は、実際の断片化DNAを反映しない結果となる。	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 $\mu$ g以上をロードしない。 RNaseでサンプルを処理する。
	アガロース濃度 泳動バッファー濃度	1%より濃いアガロースゲルを使わず、ゆっくり泳動する。 アガロースゲル上でスミアを引き起こす0.5xTAEより、1xTAE又は1xTBEの使用が好ましい。
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、穏やかに遠心(500 xg、2~3分間)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。
	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	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では、どの抗体を使えばよいのか?	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。
	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?	効率的なIPを確実にするためには、クロマチン量と抗体量の至適な比率を知っていることが重要である。抗原の特異性が低い場合や、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の効率低下につながる。
	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やGに対するアフィニティーに有意な違いがある。例えば、IgMは、protein AやGと結合する二次抗体を必要とする。
PCR	プライマー	- プライマーの鎖長: 18~24ヌクレオチド

		<ul style="list-style-type: none"> <li>- プライマーのTm : 60 ( ±3.0 )</li> <li>- プライマーの%GC : 50% ( ±4% )</li> </ul>
	コントロール : ネガティブ、ポジティブ	<ul style="list-style-type: none"> <li>- PCRのネガティブコントロール : 目的の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。</li> <li>- PCRのポジティブコントロール : インプット DNA を使ったPCR。</li> </ul>
	Orange ChIP の定量 PCR プライマーペア	キットに入っている定量 PCR プライマーはヒトの遺伝子座をターゲットとしている。
	Orange ChIP の定量 PCR プライマーは、ChIP 効率の迅速なチェックのために入っている。	クロスリンクを解除し、ChIP サンプルから DNA を精製する。そして、ChIP が成功したかどうかをチェックするために、確定しているプロモーター領域 ( c-fos, b-actin ) を増幅する Orange ChIP 定量 PCR 特異的プライマーペアを使用する。
	Orange ChIP の定量 PCR プライマーは、ChIP の特異性と効率をチェックするために入っている。	クロスリンクを解除 ( 脱クロスリンク ) し、ChIP サンプルから DNA を精製する。そして、提供されたプロモーター領域と、myoglobin exon2、BMX を増幅させるために、Orange ChIP の定量 PCR 特異的プライマーペアを使う。結果の項に記載したように、データを解析する。
<b>凍結</b>	プロトコー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。	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ステップ 2-5. 及び 6. ( 断片化クロマチン )</li> <li>- ステップ 4-13. ( ChIP 及び input : DNA )</li> <li>- 解析ステップ-5. ( input : DNA )</li> </ul>
	凍結融解を避ける。	瞬間凍結し、氷上で溶かす。

## 追記プロトコール

### パラサイト実験のためのプロトコール

#### A. in vivo でのタンパク質-DNA コンプレックスのクロスリンク

1. 37% ホルムアルデヒドを、終濃度 1% となるように培地に添加する。  
(例: 10 ml に 270  $\mu$ l。)
2. 穏やかに振とうしながら、37 で 5 分間インキュベートする。
3. 1.25 M グリシンを、終濃度 0.125 M となるように添加する。  
(例: 10 ml に 1 ml。)

#### B. 赤血球細胞の溶解 (氷上)

4. サンプルを遠心 (10 分間、13,000  $\times$ g、4 ) する。
5. 沈殿を氷冷した 1 $\times$ PBS で洗浄する。
6. 1 培地量の 1 $\times$ PBS に赤血球をサスペンドする。
7. サポニンを終濃度 0.05 % となるように添加し、穏やかに混ぜる。
8. 溶血が確認できたら、すぐに遠心 (5 分間、6,000  $\times$ g) する。
9. 上清を除き、透明になるまで氷冷した 1 $\times$ PBS で洗浄する。
10. 遠心 (10 分間、1,000  $\times$ g (4,000 rpm)、4 ) し、氷冷した 1 $\times$ PBS で洗浄する。

#### C. 溶解と核の沈殿

11. クロスリンクしたパラサイトを 3 ml の Buffer A にサスペンドし、氷上でダウンスホモジナイザーで穏やかにホモジナイズ (30 ストローク) して、核を調製する。
12. 等量の 0.25 M スクロースを含む Buffer A を加え、核を回収する。スイングアウトローターで遠心 (10 分間、500  $\times$ g (2,000 rpm)、4 ) する。
13. 核を Buffer A にサスペンドし、ステップ 12. を繰り返す。

#### D. クロマチン断片化

14. 沈殿 3~5 $\times$ 10<sup>8</sup> パラサイト/150  $\mu$ l となるように、Buffer A にサスペンドする。
15. Bioruptor™ (Diagenode, catalog # UCD-200) を使って、[30 秒 "ON" /30 秒 "OFF" ] でトータル 10 分間、断片化する。
16. 細胞残渣を除くため、遠心 (20 分間、13,000  $\times$ g、4 ) する。
17. 上清を回収し、分注して凍結する。

### 再ChIPのためのプロトコール

ある抗体でChIPして、そのChIPサンプルを次の抗体で再ChIPすることができる。この方法は2つのChIPラウンドを含む。

1. 第1ラウンドは、本マニュアルのステップ 3-1. ~ ステップ 3-13. に記載されている手順で行う。
2. ビーズの洗浄の後（ステップ 3の最後）、免疫コンプレックスを、50  $\mu$ lのBuffer Cで室温で10分間インキュベートして溶出する（ステップ 4-1.で400  $\mu$ lの変わりに50  $\mu$ lを使用し、その他はステップ 4-1.とステップ 4-2.に記載したように行う）。
3. トータル150  $\mu$ lの溶出液を得るために、さらに2回溶出を繰り返す。
4. 75  $\mu$ lの溶出液から次のようにDNAを調製する。：クロスリンクの解除（脱クロスリンク）、精製、定量リアルタイムPCRによる直接解析（第1ラウンドChIPのみ）（ステップ 4-4. ~ 13.）
5. 残った75  $\mu$ lの溶出液をChIP buffer 1 $\times$ で10倍に希釈し、最終容量を750  $\mu$ lとする。ここから、第2ラウンドChIPである。
6. 希釈したChIPサンプル（又は溶出液）に抗体を添加する。
7. ローテーターで一晩、4  $^{\circ}$ Cでインキュベートする。コントロールを含む（ステップ 3-7.及び8.）。
8. 免疫沈降とビーズの洗浄に進む（ステップ 3-9. ~ 13.）。
9. 第1ラウンドの再ChIP（3 $\times$ 50  $\mu$ lを使用）（上記2.及び3.）で記載したように、溶出を行う（ステップ 4-4. ~ ステップ 5は、マニュアルに記載したように行う（クロスリンクの解除、DNA精製、定量PCR））。

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

## 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](mailto: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](mailto:info@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](mailto:infousa@diagenode.com)  
Diagenode HP : <http://www.diagenode.com>