

# Orange ChIP Kit 簡易プロトコール (version 01)

詳細については Instruction Manual (英文、又は日本語訳) を参照  
(Code No. 317-80621)

## キット内容 (18 回分)

断片化モジュール (ステップ 1、2)		
内容	容量	保存温度
1.25 M glycine	10 ml	4
Buffer A (クロマチン断片化)	5 ml	4

抗体モジュール (ステップ 3)		
内容	容量	保存温度
Antibody anti-histone modification : H3K4me3	20 $\mu$ l	-20

ChIPモジュール (ステップ 3、4)		
内容	容量	保存温度
Buffer B (5 $\times$ ChIP)	5 ml	4
Protease inhibitor mix (P.I.) *	1 タブレット	-20
pre-blocked protein A coated beads	880 $\mu$ l	4 (凍結厳禁)
Wash buffer - 1	10 ml	4
Wash buffer - 2	20 ml	4
Wash buffer - 3	20 ml	4
Buffer C (溶出)	10 ml	4
5M NaCl	400 $\mu$ l	4
DNA co-precipitant	100 $\mu$ l	-20
DNA precipitant	1,000 $\mu$ l	4
H <sub>2</sub> O	10 ml	4

\* : タブレットを400  $\mu$ lの水に溶かし、-20 で保存してください。

定量PCRモジュール (ステップ 5)		
(定量PCR用プライマー)		
内容	容量	保存温度
c-fos promoter primer pair	50 $\mu$ l	-20
b-actin promoter primer pair	50 $\mu$ l	-20
Myoglobin exon 2 primer pair	50 $\mu$ l	-20
BMX primer pair	50 $\mu$ l	-20

マニュアル類	
Instruction Manual (英文マニュアル)	1部
Instruction Manual (日本語訳)	1部
簡易プロトコール (本紙)	1部

## スターティングマテリアル

培養細胞 必要な細胞数 : 10<sup>5</sup> 細胞 / ChIP

## キット以外に必要なもの

### 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 スクレーピングメソッド)
- ・ トリプシン-EDTA (ステップ 1-B 細胞カウント、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)
- ・ エタノール 100%
- ・ エタノール 70%
- ・ リアルタイムPCR試薬
- ・ RNase (1  $\mu$ g/  $\mu$ l)
- ・ アガロース
- ・ TAEバッファー
- ・ DNA分子量マーカー

### 装置

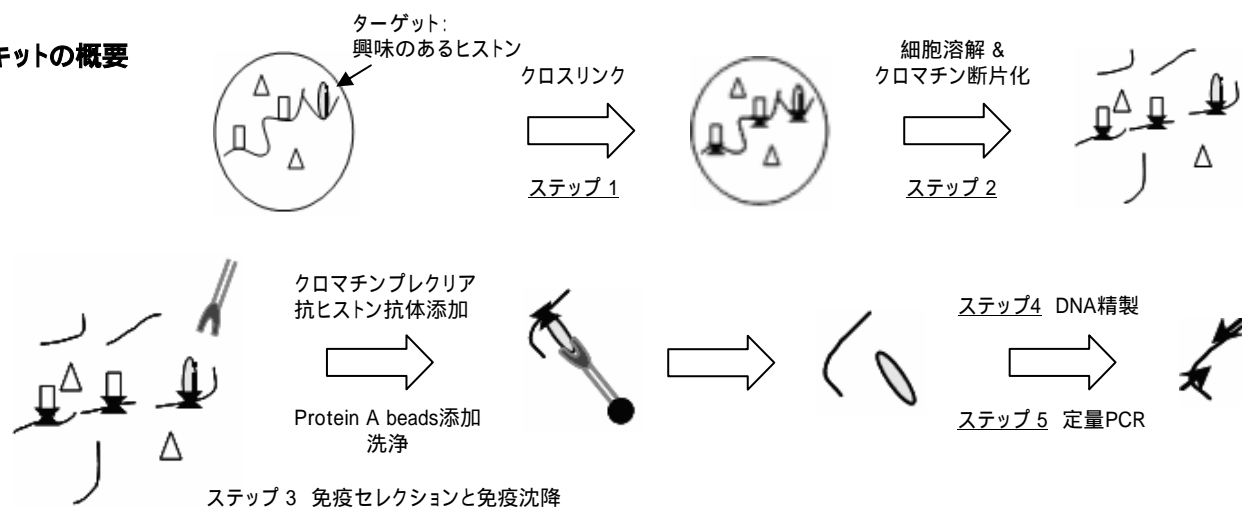
- ・ 冷却遠心機 (1.5 ml チューブ用)
- ・ 遠心機 (15 ml 及び 50 ml チューブ用)
- ・ 振とう台
- ・ セルカウンター
- ・ 密閉式超音波細胞破碎装置 Bioruptor™ \*
- ・ ローテーター
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ サーモシェーカー (65 )
- ・ 微量遠心機とローテーターのある低温室
- ・ リアルタイムPCR装置
- ・ アガロースゲル電気泳動装置

\* : Bioruptor™はコスモ・バイオから販売されています。

## Orange ChIP Kitのタイムスケジュール

工程	日程	所要時間
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
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
ステップ 5 定量PCR	3日目	4時間

## キットの概要



## ステップ 1 - 細胞の固定と回収

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。

### <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 >

培養細胞

終濃度1%となるように37%ホルムアルデヒドを培地に直接添加  
振とう台で穏やかにインキュベート(10分間、室温)  
1.25 M glycine 1/10量添加 (終濃度125 mM)  
均一に混合する (クロスリンクの停止)  
培地を除く  
氷冷した 1×PBS 10 mlで細胞を洗浄  
バッファーを除く  
氷冷した 1×PBS 10 mlで細胞を洗浄  
バッファーを除く  
Buffer A 500 μl 添加  
スクレーピングで細胞を集める  
細胞を15 ml チューブに移す  
細胞懸濁液の終濃度を 10<sup>7</sup> 細胞 / 800 μlに調整する。  
(Buffer Aで調整)

ステップ 2へ

### < ステップ1-B 細胞カウントのためのトリプシンメソッド >

1×PBS、培地、トリプシン-EDTA を温めておく

培養細胞

培地を除く  
温めておいた 1×PBS で細胞をリンス  
(3×10<sup>6</sup> 細胞に 3.5 ml、1×10<sup>7</sup> 細胞に 10 ml)  
振とう(2分間)  
バッファーを除く  
トリプシン-EDTA 添加  
(3×10<sup>6</sup> 細胞に 1 ml、1×10<sup>7</sup> 細胞に 3 ml)  
インキュベート(1分間)  
細胞がフラスコの底から剥がれたことを目視にて確認  
すばやく培地添加 (トリプシンの中和)  
(3×10<sup>6</sup> 細胞に 2 ml、1×10<sup>7</sup> 細胞に 6 ml)  
[培地 - 細胞] 混合液でフラスコの側面を洗い流す  
細胞を15 ml 又は 50 ml チューブに移す

細胞をカウントする

## ステップ 2 - 細胞の溶解とクロマチンの断片化

ステップ 1の細胞懸濁液(クロマチンを含む)

適当なチューブに移す

注意: 1.5 ml チューブに 300 μl 以上入れない  
15 ml チューブに 2 ml 以上入れない

Bioruptor™で断片化

[ 30 秒間 "ON" / 30 秒間 "OFF" ] で 10サイクル

遠心(5 分間、14,000 ×g、室温)

上清(断片化クロマチン)

10 μl  
コントロール  
(解析ステップへ)

残り  
ChIP 及び インプットサンプル用

ステップ 3へ

1 IP あたり 10 μl の断片化クロマチンを使用  
75 μl(6 IP用)、150 μl(12 IP用)  
すぐに使用しない場合は凍結チューブに分注し  
液体窒素で瞬間凍結 -80 で保存

## ステップ 3 免疫セレクションと免疫沈降

### < ブレクリアと免疫セレクション >

IPインキュベーションミックスを準備する  
(1ChIPあたり、P.I. 4 μl、Buffer B 20 μl、H<sub>2</sub>O 76 μl)

IPインキュベーションミックス 90 μl を 1.5 ml チューブに入れる  
(1 ChIPアクセシに 1チューブ)

断片化クロマチン 10 μl 添加

希釈した断片化クロマチン 10 μl を  
インプットサンプル用にキープ

pre-blocked protein A coated beads 20 μl 添加

ローテーターでインキュベート(60分間、4 )  
(サンプルブレクリア)

遠心(2分間、500 ×g、4 )

上清

100 μl を新しい 1.5 ml チューブに移す

抗ヒストン抗体添加

antibody anti-histone H3[K4me3]  
(キットに添付) 1 μl (0.5 μg)  
その他の抗体 0.5 ~ 2 μg

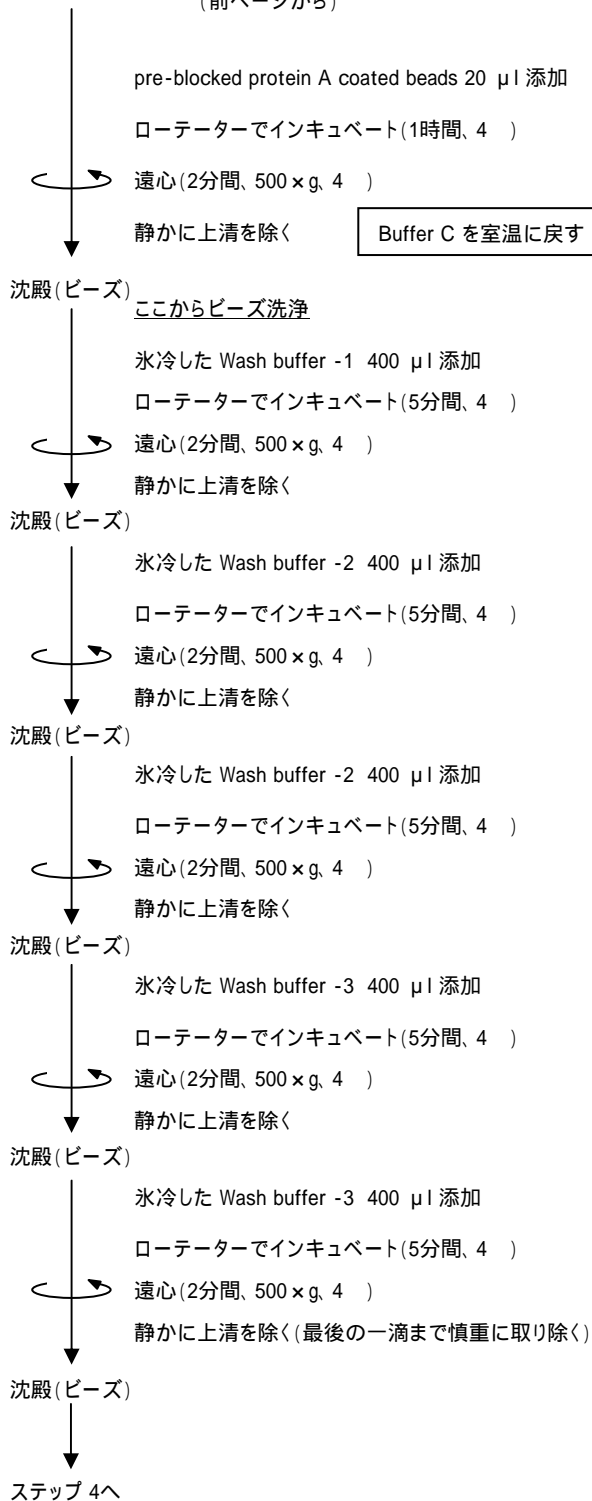
数回転倒混和

ローテーターでインキュベート(一晚、4 )

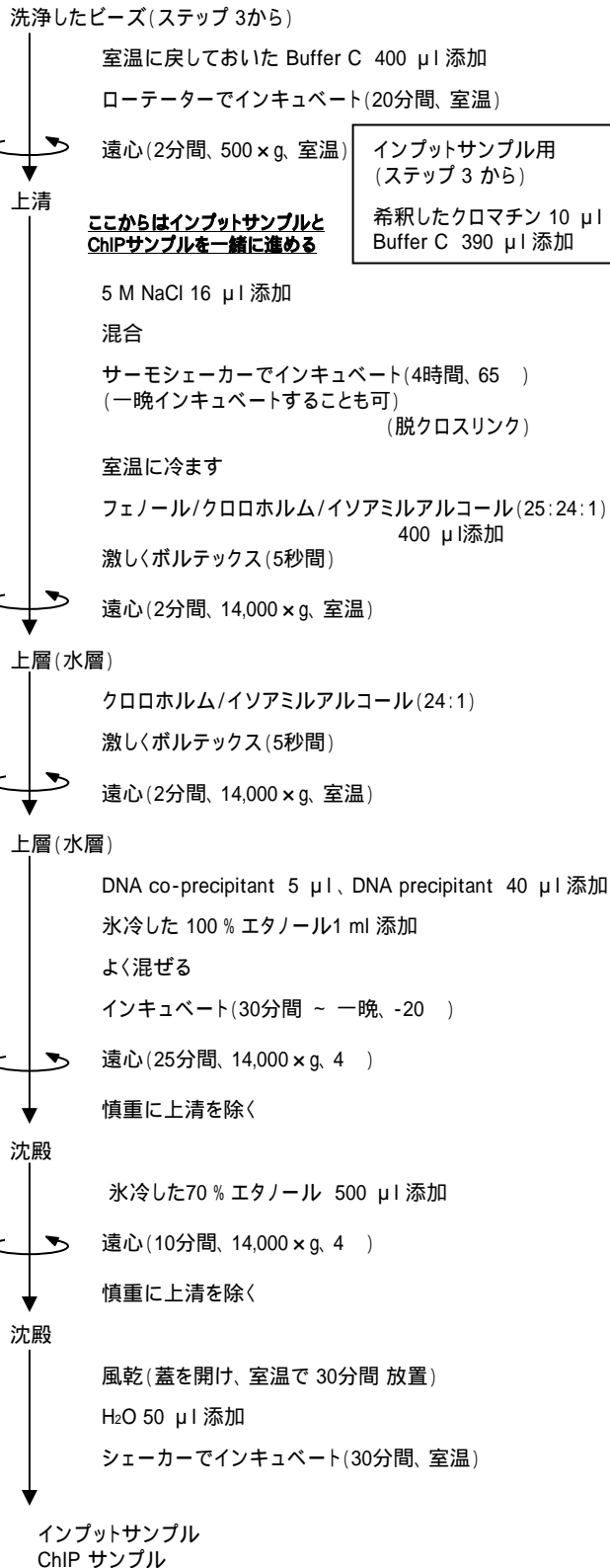
免疫沈降(次ページ)へ

## < 免疫沈降、ビーズの洗浄 >

[ プレクリアした断片化クロマチン - 抗体 ]  
(前ページから)



## ステップ 4 DNA精製



## ステップ 5 定量PCR

定量PCRの詳細はInstruction Manualを参照

### 反応液 (1反応)

バッファーマックス	12.5 $\mu$ l
Primer pair	2.0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	5.5 $\mu$ l
DNAサンプル	5 $\mu$ l
トータル量	25 $\mu$ l

### サイクル条件

95	3分間	} $\times$ 40サイクル
95	15秒間	
60	45秒間	

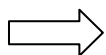
### 検出

SYBR Green

## 解析ステップ 断片化したクロマチンの解析

解析ステップについてはInstruction Manualを参照

お問い合わせ：  
株式会社ニッポンジーン 研究試薬部  
930-0834 富山県富山市同屋町1-8-7  
TEL：076-451-6548 FAX：076-451-6547  
E-mail：info@nippongene.com



データ解析へ