

転写因子クロマチン免疫沈降キット Red ChIP Kit™

NIPPON GENE Code No. 310-80471
(Diagenode Catalog #: kch-redTBP-012)

Instruction Manual (version 02) (日本語訳 第2版)

このマニュアルは、Diagenode 社の Red 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
キットのモジュールとプロトコールの概要	p 7
キットのアッセイショートプロトコール	p 8
4. キットのアッセイプロトコール	p 11
スターティングマテリアル-培養細胞	p 11
ステップ 1 - 細胞の固定と回収	p 11
ステップ 2 - 細胞の溶解	p 15
ステップ 3 - クロマチン断片化	p 16
ステップ 4 - 免疫沈降	p 17
ステップ 5 - DNA精製	p 19
ステップ 6 PCR	p 21
解析ステップ - 断片化したクロマチンの解析	p 23
Red ChIP Kitを使った実験例：転写因子ChIP	p 24
5. トラブルシューティングガイド	p 27
6. 参考資料	p 29
7. お問い合わせ	p 29

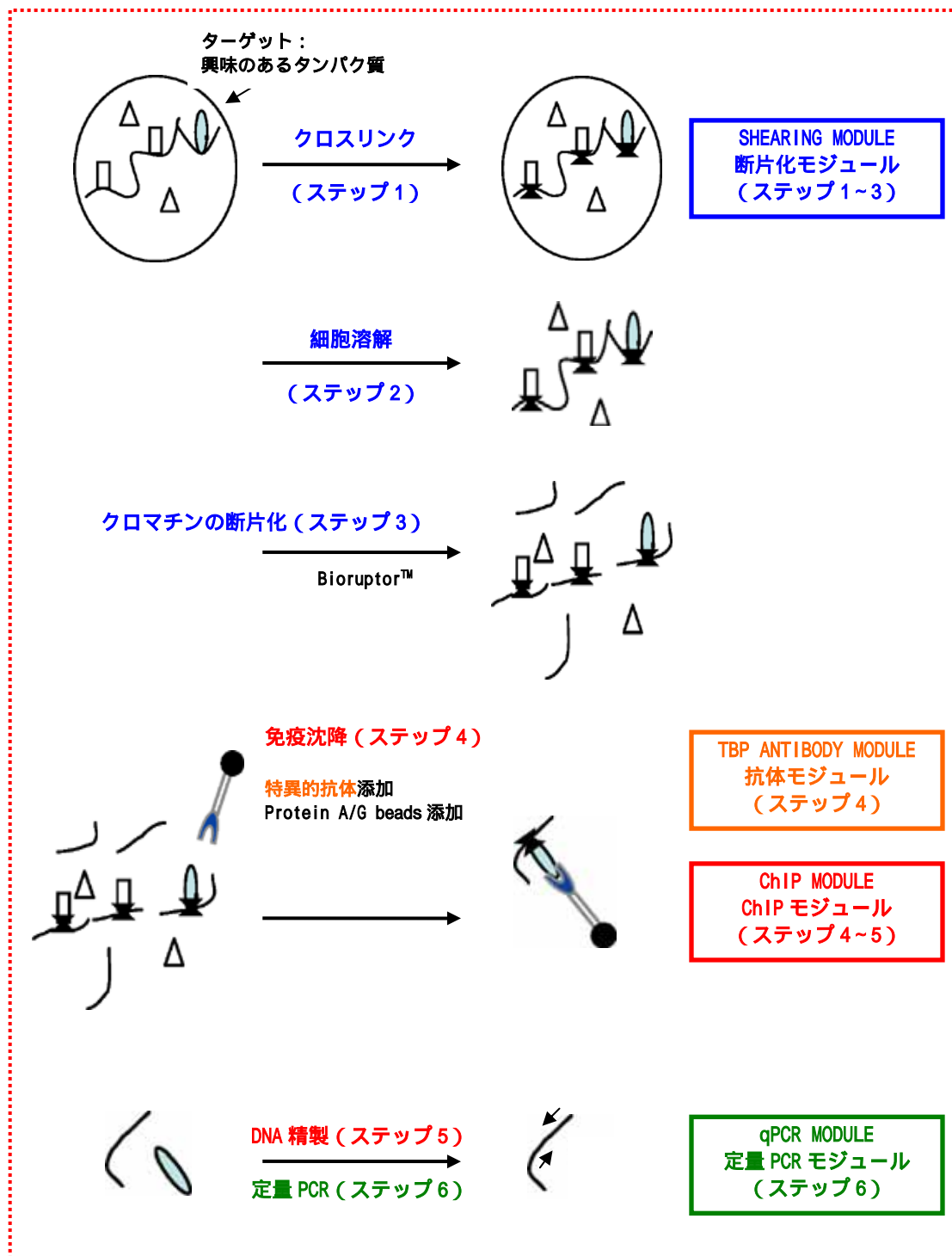
1. はじめに

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を決定するために使われています (1)。

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) は断片化され、興味のあるタンパク質と結合した DNA 断片が、特異的な抗体により免疫沈降 (IP) されます。最後に、DNA-タンパク質のクロスリンクが解除され、定量ポリメラーゼ連鎖反応 (定量 PCR)、ChIP-chip やシーケンスによって、DNA 中の特定配列の存在が試験されます。その沈降の中に特定配列がたくさん (多量に) あるということは、興味のあるタンパク質がその配列と *in vivo* で結合しているということを示しています。

生きている細胞において、DNA-タンパク質の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、アミノ基またはイミノ基と核酸と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)。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される必要があります。DiagenodeのBioruptor™は、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、断片化モジュールは簡単に高い再現性をもつ断片化の方法としてDiagenodeから入手できます。そして、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です。特異的な免疫沈降による特定DNA断片の相対的な量は、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。局在因子は、異なる遺伝子座の特異的プライマーを使った定量PCRにより、ほとんどが決定されます。そしてまた、免疫沈降したDNAをマイクロアレイ解析 (ChIP-on-chip) (3) (4) (5) やシーケンス (ChIP-Seq) (6) をすることにより、遺伝子座の大きなサブセット、染色体、ゲノム全体の一斉解析 (プロファイリング) を行うこともできます。

2. キットの概要



Red ChIP kitは、4つのモジュールから構成されています。(6ページ参照)

3. キットの構成

キット内容

本品には、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 スクレーピング法に進む場合）
- ・トリプシン-EDTA（ステップ 1-b トリプシン処理法に進む場合）
- ・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 又は TE
- ・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（0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ）
- ・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 $^{\circ}\text{C}$ ）
- ・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。

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下さい。)

断片化モジュール (ステップ 1~3)			
内容	コメント	容量	保存
Buffer A (細胞回収)	塩とイオンキレート剤ミックスが含まれます。 使用前にホルムアルデヒドを添加してください。	10 ml	4
1.25 M glycine	-	10 ml	4
Buffer B (溶解1)	界面活性剤とイオンキレート剤ミックスが含まれます。	30 ml	4
Buffer C (溶解2)	塩とイオンキレート剤ミックスが含まれます。	30 ml	4
Buffer D (クロマチン断片化)	界面活性剤及びイオンキレート剤ミックスが含まれます。 白色の沈殿が析出した場合は、室温で沈殿を溶かしてからご使用 ください。	3 ml	4

抗体モジュール (ステップ4)			
内容	コメント	容量	保存
Antibody anti-TBP (抗TBP抗体)	8 µg/µl ; 0.02 %のアジ化物が含まれます。	10 µl	-20

転写因子ChIPモジュール (ステップ4~5)			
内容	コメント	容量	保存
Buffer E (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.)	Protease inhibitor mix 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×のストック溶液になります。	1 タブレット	-20
Pre-blocked protein A/G coated beads	18 IP用の1:3懸濁液です。 0.02 %のアジ化物が含まれます。	630 µl	4 凍結厳禁
5 % BSA	50×のストック溶液です。	200 µl	-20
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。	15 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。	9 ml	4
Wash buffer-3	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。	9 ml	4
Wash buffer-4	イオンキレート剤ミックスが含まれます。	15 ml	4
Buffer F (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
5M NaCl	-	400 µl	4
DNA co-precipitant	-	100 µl	-20
DNA precipitant	-	1,000 µl	4
H ₂ O	-	10 ml	4

定量PCRモジュール (ステップ6)			
内容	コメント	容量	保存
GAPDH promoter primer pair	5 µM each (リバースプライマー & フォワードプライマー)	50 µl	-20
GAPDH p-0.5 kb primer pair	5 µM each (リバースプライマー & フォワードプライマー)	50 µl	-20
GAPDH p-1.0 kb primer pair	5 µM each (リバースプライマー & フォワードプライマー)	50 µl	-20
c-fos promoter primer pair	5 µM each (リバースプライマー & フォワードプライマー)	50 µl	-20
b-actin promoter primer pair	5 µM each (リバースプライマー & フォワードプライマー)	50 µl	-20
Myoglobin exon 2 primer pair	5 µM each (リバースプライマー & 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ルの概要

転写因子ChIPのためのDiagenodeのRed ChIP kitは、**クロマチン断片化**、**抗体検出**、**クロマチン免疫沈降**、**定量PCR** の4つのモジュールから構成されています。

キットには、細胞回収からPCRまで、ChIP解析18回分の試薬が入っており、各モジュールには至適なバッファーとプロトコルが用意されています。

表2

モジュール		日程	所要時間
断片化モジュール			
ステップ1 (a又はb)	細胞の固定と回収	1日目	1時間
ステップ2	細胞溶解	1日目	30分間
ステップ3	クロマチン断片化	1日目	30分間
抗体モジュール & 転写因子ChIPモジュール			
ステップ4 (1~4)	免疫沈降	1日目	10分間 1回
ステップ4 (5~10)		1日目	30分間 + 一晩
ステップ5 (1~5)	ビーズ洗浄	2日目	1.5時間
ステップ5 (6~15)	DNA精製	2日目	6.5時間
定量PCRモジュール			
ステップ6	定量PCR	3日目	3時間

断片化したクロマチンの解析		
解析ステップ1~5	2日目	ステップ5 (5~15) と同様
解析ステップ6~7	3日目	2時間
解析ステップ1と2を1日目 (10分間 + 一晩) 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。		

キットのアッセイショートプロトコール (ステップ1から6)

Red ChIP : 転写因子クロマチン免疫沈降

-----1 日目-----

スターティングマテリアル- 培養細胞

各ChIP解析は 1×10^6 細胞を必要とする。スケールは調整する。(表 13)

ステップ1- 細胞の固定と回収

断片化モジュール

細胞は剥ぎ取る前 (ステップ 1-a) または回収した後 (ステップ 2-b) に固定化することができる。自分の ChIP 研究に適した方法を選択する。セクション 4. キットのアッセイプロトコール参照。

ステップ2- 細胞の溶解

1. ステップ1の後、遠心 (5分間、 $500 \times g$ (1,600 rpm)、4) する。上清を捨て、沈殿を残す
2. 沈殿 (最大 5×10^7 細胞から得られたもの) に 15 ml の氷冷した Buffer C を添加する。ピペティングにより数回上下させて沈殿をサスペンドし、穏やかに混合しながら 4 で 10 分間インキュベートする。
3. 再び遠心 (5分間、 $500 \times g$ (1,600 rpm)、4) して沈殿させ、上清を捨てる。
4. *Protease inhibitor mix* (P.I.) を氷冷した Buffer D に添加する。調製した P.I. は 25x である。 3×10^6 細胞の各サンプルに対して 100 μ l の Buffer D と 4 μ l の P.I. を添加する。
5. 1×10^6 細胞の各サンプルに対して、30 μ l の調製したフレッシュな [P.I. - Buffer D] を添加する (表 12 参照)。沈殿を [P.I. - Buffer D] にサスペンドする。これは断片化 (ステップ 3) のために用意されたクロマチンを含むサンプルである。

ステップ3- クロマチン断片化

1. クロマチンを含むサンプルを適当なチューブに移す。
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。サンプルは 0 に近い温度に保つ。各サンプルは [30 秒 “ON” / 30 秒 “ON”] で 15 サイクル超音波破碎する。トータル時間は 15 分間である。
3. 断片化の後、15 ml チューブを使用している場合は、中身を新しい 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)、4) する。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. インプットサンプル調製のため、1.5 ml チューブに断片化したクロマチン 100 μ l (3×10^6 細胞相当) づつを分注する。それは **ステップ 5-5** に進むまで ChIP サンプルと一緒に -20 に置いておくことができる。
6. 250 μ l または 450 μ l の断片化した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、-80 で保存する。断片化したクロマチンを直接 ChIP に使用することもできる (**ステップ 4**)。

ステップ4- 免疫沈降

ビーズの調整：(下記の1~4を一度だけ行う必要がある。)

1. 2 ml の[P.I. - ChIP buffer 1x]を準備する。
2. キットに入っている *pre-blocked protein A/G bead* の懸濁液をとる。ビーズを沈殿させるため、遠心(2分間、500×g (3,000 rpm))し、上清を除く。
3. ビーズを洗浄するため、1 ml の調製したてのフレッシュな[P.I. - ChIP buffer 1x]をビーズに添加する。再びビーズを沈殿させるために遠心(2分間、500×g (3,000 rpm))し、上清を除く。
4. 1:3のビーズ懸濁液となるよう、沈殿させたビーズに415 μl の[P.I. -ChIP buffer 1x]を添加する。ビーズはクロマチン免疫沈降実験用に調製された状態となる。12~18 IP に直接使用する(次の工程、表14)か、4 で保存する。

免疫沈降：

5. IP インキュベーションミックスを調製する。次の試薬を混合する。: BSA、P.I.、Buffer E、ビーズ、水。2タイプのIP インキュベーションミックス調製することができる。(下の表と表14、表15に示す):

	IP インキュベーションミックスに含まれる各試薬の量:					総量
	5% BSA	P.I.	Buffer E	ビーズ	水	
TBP ChIP	6 μl	10 μl	60 μl	30 μl	163.5 μl	269.5 μl
Other ChIP	6 μl	10 μl	60 μl	30 μl	(164 v.a.) μl	x

備考: “v.a.” は、IP インキュベーションミックスに添加する抗体の容量に相当する(この後の9)。

6. 各 TBP-ChIP のために、1 IP チューブあたり 269.5 μl の調製したてのフレッシュな IP インキュベーションミックスを添加する。
7. キットに入っている *anti-TBP* ではなく他の抗体を使用した ChIP のために、1 IP チューブあたり x μl の調製したてのフレッシュな IP インキュベーションミックスを添加する(表15)。
8. 1 IP チューブあたり 30 μl の断片化クロマチンを添加する(ステップ3-6から)。
9. 最後に、1IP チューブに対して、*anti-TBP* 又は興味のある抗体を添加する。キットに入っている抗体 *anti-TBP* : 1 IP あたり 4 μg (0.5 μl) を使用する。その他の抗体 : 2~5 μg の抗体(容量は使用する抗体に依存する。)を使用する。
10. 数回転倒混和し、ローテーターで1晩、4 でインキュベートする。

-----2日目-----

ステップ5- DNA 精製

ビーズ洗浄とビーズからのDNA溶出 (ChIPサンプル)：

1. インキュベートした後、遠心(2分間、500×g (3,000 rpm))、4)してビーズを沈殿させる。上清を穏やかに取り除く。
2. 次のようにして、ビーズ洗浄に進む。1 IP チューブあたり 350 μl の氷冷した洗浄バッファーを添加する。回転させながら5分間インキュベートする。遠心(2分間、500×g (3,000 rpm))、4)してビーズを沈殿させる。穏やかに上清を除く。前述したような洗浄を繰り返す。

返す。洗浄には次のバッファーを使用する。: 1/ wash buffer-1 で、洗浄 2 回; 2/ wash buffer-2 で、wash 1 回; 3/ wash buffer-3 で、wash 洗浄 1 回 ; 4/ wash buffer-4 で、洗浄 2 回。

3. 400 μ l の Buffer F (あらかじめ室温に置いておいた溶出バッファー) を沈殿させたビーズに添加し、ビーズに結合している [DNA-タンパク-抗体] コンプレックスを溶出する。回転させながら室温で 20 分間インキュベートする。
4. 遠心 (2 分間、500 \times g (3,000 rpm)、室温) してビーズを沈殿させる。上清を新しいキレイな 1.5 ml チューブに移す。これは IP で分離された DNA を溶出することに相当する。
5. 最終容量を 400 μ l にするために、300 μ l の Buffer F (室温の溶出バッファー) を 100 μ l の断片化したクロマチンサンプル (ステップ 3-5 から) に添加する。それがインプットサンプルに相当する。

ChIP サンプル及びインプットサンプルからの DNA の回収と精製 :

6. キットに入っている 5M NaCl を 16 μ l 添加、混合し、クロスリンクを外すため、サーモシェーカーで 65 $^{\circ}$ C 4 時間インキュベートする。
7. サンプルを室温に冷まし、400 μ 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、5 秒間激しくボルテックスする。
8. 遠心 (2 分間、14,000 \times g (13,000 rpm)、室温) する。上層 (水層) を新しい 1.5 ml チューブに移す。
9. 400 μ l のクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を添加し、5 秒間激しくボルテックスする。
10. 遠心 (2 分間、14,000 \times g (13,000 rpm)、室温) する。上層 (水層) を新しい 1.5 ml チューブに移す。
11. 1 チューブあたり : キットに入ってる DNA co-precipitant 5 μ l と DNA precipitant 40 μ l を添加する。次に 1ml の 100% エタノールを添加する。よく混ぜる。-20 $^{\circ}$ C に 30 分間静置する。
12. 遠心 (25 分間、14,000 \times g (13,000 rpm)、4 $^{\circ}$ C) する。慎重に上清を除き、500 μ l の氷冷した 70 % エタノールを沈殿に添加する。
13. 遠心 (10 分間、14,000 \times g (13,000 rpm)、4 $^{\circ}$ C) する。慎重に上清を除き、残ったエタノールを蒸発させるために室温に 30 分間 風乾させる (蓋を開けておく)。沈殿は : 1/断片化されたクロマチンから精製された DNA (インプットサンプル) と 2/ChIP によって分離された DNA (ChIP サンプル) である。
14. 200 μ l の水を ChIP サンプルに添加する。インプットサンプルには、100 μ l の水を添加する。
15. 沈殿を溶かすため、チューブを 30 分間、12,000rpm の室温のシェーカーに置く。

-----3 日目-----

ステップ 6- 定量 PCR

セクション 4 キットのアッセイプロトコール参照

定量 PCR モジュール

4. キットのアクセイブプロトコール

Red ChIP : 転写因子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

細胞は直径140 mmの培養ディッシュで培養する。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。

- 備考:**
- U2OS細胞の場合、コンフルエントまで増殖すると140 mmディッシュあたり約 10^7 細胞となる。(他のタイプの細胞では、15 cmディッシュあたり、少なくとも 3×10^6 の細胞が得られる。)以下のプロトコールはトータル 5×10^7 細胞用である。
 - 細胞は誘導や処理を受けることができる。そして、処理した細胞も未処理の細胞と同様に、ChIP研究用に調製することができる。

各ChIP解析は 1×10^6 の細胞を必要とする。スケールは調整する(表13)。

ステップ1 - 細胞の固定と回収

断片化モジュール

細胞は剥ぎ取る前(ステップ1-a)、または回収した後(ステップ2-b)に固定化することができる。両方の方法を以下に示す。自分のChIP研究に適した方法を選択する。

ステップ1-a スクレーピング法

1. 下記の表3に示したように、37%ホルムアルデヒド液(w/v)とPBSとBuffer Aを混合し、クロスリンクバッファーを準備する。ホルムアルデヒドの終濃度は1%である。

注意: ホルムアルデヒドはドラフト内で取り扱う。

表3

クロスリンクバッファー	3×10^6 cells	1×10^7 cells	5×10^7 cells
37%ホルムアルデヒド(w/v)	90 μ l	270 μ l	1,350 μ l
Buffer A	210 μ l	630 μ l	3,150 μ l
PBS	3 ml	9 ml	45 ml
総量	3.3 ml	9.9 ml	49.5 ml

備考: [11%ホルムアルデヒド(final)in Buffer A]の混合液を調製し、細胞の入っているフラスコの培養液に1:10(v/v)で直接添加することもできる。(細胞が浮遊して増殖している場合はこの方法を選択する。)すばやく混合し、室温で10分間振とう台でインキュベートする。そして、ステップ1-a-4-備考に進む。

2. 培養ディッシュまたはフラスコから培地を完全に取り除く。
3. 用意したフレッシュなクロスリンクバッファーを細胞に添加する(表3)。 3×10^6 細胞に対して約3 mlを添加する。すばやく混合し、室温で10分間インキュベートする。

備考： クロスリンクの時間は細胞のタイプと興味のあるタンパク質によって異なる。固定ステップを10分、20分、30分と異なるインキュベート時間に最適化することができる。クロスリンクの時間は30分より長くならないようにする。30分より長いクロスリンクでは効率的な断片化ができない。

- クロスリンク反応を停止するために、glycineを細胞に加える。3 × 10⁶の細胞に対して約300 μlのglycineを添加する（表4）。キットに含まれるglycineストックは1.25 Mなので、10倍に希釈され終濃度は0.125 Mとなる。混合し、室温で5分間インキュベートする。（glycineはホルムアルデヒドと反応しクロスリンク反応を止める。）

表4

固定の停止	3 × 10 ⁶ cells	1 × 10 ⁷ cells	5 × 10 ⁷ cells
1.25 M glycine	330 μl	990 μl	4950 μl

備考： [11 % ホルムアルデヒド(final) in Buffer A]の混合液を1:10で直接フラスコの中の培養細胞に添加した場合（浮遊して増殖する細胞の場合に選択する方法）は、[ホルムアルデヒド- Buffer A - 培地]の総量に対して1.25M glycineを1:10(v/v)添加する。すばやく混合し、室温で5分間インキュベートする。そして、遠心および洗浄のステップへ進む。

- バッファーを完全にアスピレート（吸引）する。

備考： 細胞が浮遊して増殖している場合は、ここで遠心により細胞を回収する。

- クロスリンクした細胞を氷冷したPBSで2回洗浄する。3 × 10⁶の細胞に対して5 mlの氷冷したPBSを使用する。各洗浄で細胞にバッファーを添加し完全に取り除く。

細胞の洗浄 （洗浄1回あたり）	3 × 10 ⁶ cells	1 × 10 ⁷ cells	5 × 10 ⁷ cells
PBS	5 ml	15 ml	75 ml

備考： 細胞が接着している場合は、この洗浄ステップは培養デッシュ上で行う。細胞が浮遊して増殖している場合は、PBSでの洗浄ステップの後で、遠心して細胞を回収する。

- 約3 × 10⁶細胞に対して500 μlの氷冷したBuffer Bを添加して（表5）、培養デッシュまたはフラスコから細胞を剥がす。

表5

セルスクレーピング	3 × 10 ⁶ cells	1 × 10 ⁷ cells	5 × 10 ⁷ cells
Buffer B	500 μl	1.5 ml	7.5 ml

備考： 細胞が浮遊している場合は、ここでは細胞は剥がさずに遠心して回収する。

- 新しいコニカルチューブに移し、ステップ 2へ進む。

ステップ1-b トリプシン処理法

1. PBS、培地、トリプシン-EDTAをあらかじめ温めておく。
2. 古い培地を取り除き、温めておいたPBSで細胞をリンスする。(表6)。ディッシュを2分間振とうする。PBSを取り除く。

表6

細胞のリンス	3 × 10 ⁶ cells	1 × 10 ⁷ cells	5 × 10 ⁷ cells
PBS	3.5 ml	10 ml	50 ml

3. 接着細胞の入っている組織培養のフラスコ、又はディッシュに滅菌したトリプシン-EDTAを添加する(表7)。トリプシン-EDTAによる短い処理は、組織培養のフラスコの底から接着細胞を剥がす。

備考: 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7

細胞剥離	3 × 10 ⁶ cells	1 × 10 ⁷ cells	5 × 10 ⁷ cells
トリプシン-EDTA	1 ml	3 ml	15 ml

4. 1分後、細胞がフラスコの底から取れたかどうか、目視にて確認する。

備考: 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を肉眼で観察できる。

5. 細胞が剥がれたら、すばやく培地を細胞に添加する(表8)。培地の添加はトリプシンを不活性化する。

表8

トリプシンの中和	3 × 10 ⁶ cells	1 × 10 ⁷ cells	5 × 10 ⁷ cells
培地	2 ml	6 ml	30 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。
8. 遠心(10分間、500 × g (1,600 rpm)、室温)し、上清を除く。
9. 細胞を培地にサスペンドする。5 × 10⁶細胞に対して1 mlの培地を使用する(表9)。

表9

細胞のサスペンド	3 × 10 ⁶ cells	1 × 10 ⁷ cells	5 × 10 ⁷ cells
培地	600 μl	2 ml	10 ml

10. 表10に示したようにBuffer Aとホルムアルデヒドの混合液を準備する。調製したてのフレッシュなクロスリンクバッファーを固定のために[細胞と培地]に添加する。穏やかに回転させながら室温で10分間インキュベートする。これがクロスリンクステップである。

注意：

- ホルムアルデヒドはドラフト内で扱う。
- クロスリンクの後、サンプルはずっと氷冷しておく。
- 使用直前にフレッシュなバッファーを調製する。

表10

クロスリンクバッファー	3 × 10 ⁶ cells	1 × 10 ⁷ cells	5 × 10 ⁷ cells
Buffer A	45 μl	140 μl	700 μl
ホルムアルデヒド	20 μl	60 μl	300 μl

11. [細胞と培地]溶液の総量の約1:10(v/v)に相当するglycine (1.25 Mストック溶液を使用)を細胞に添加する(表11)。均一に混ぜる。これはホルムアルデヒドの反応を止めるためのものである。

表11

固定の停止	3 × 10 ⁶ cells	1 × 10 ⁷ cells	5 × 10 ⁷ cells
1.25 M glycine	66 μl	220 μl	1,100 μl

12. 遠心(5分間、500 × g (1,600 rpm)、4)して、細胞を沈殿させる。上清を取り除く。

13. 氷冷したPBSで沈殿させた細胞を洗浄する。5 × 10⁷の細胞に対して15 mlのPBSを添加し、ピペティングで細胞を上下させサスペンドする。すぐに遠心(5分間、500 × g (1,600 rpm)、4)し、上清を捨てる。

細胞の洗浄	3 × 10 ⁶ cells	1 × 10 ⁷ cells	5 × 10 ⁷ cells
PBS	900 μl	3 ml	15 ml

14. 15 mlの氷冷したBuffer Bを5 × 10⁷の細胞の沈殿に対して15 ml添加する。細胞をピペティングで数回上下させてサスペンドし、穏やかに混ぜながら4 で10分間インキュベートする。ステップ2へ進む。

細胞のサスペンド	3 × 10 ⁶ cells	1 × 10 ⁷ cells	5 × 10 ⁷ cells
Buffer B	900 μl	3 ml	15 ml

ステップ2 - 細胞の溶解

断片化モジュール

備考: - 1サンプルあたり、最低 3×10^6 、最大 5×10^7 細胞を使用する。
- サンプルはずっと氷冷しておく。

1. 遠心（5分間、 $500 \times g$ （1,600 rpm）、4 ）する。上清を捨て、沈殿を残す。
2. 沈殿（最大 5×10^7 細胞から得られたもの）に15 mlの氷冷したBuffer Cを添加する。ピペティングにより数回上下させて沈殿をサスペンドし、穏やかに混合しながら4 で10分間インキュベートする。

細胞のサスペンド	3×10^6 cells	1×10^7 cells	5×10^7 cells
Buffer C	900 μ l	3 ml	15 ml

3. 再び遠心（5分間、 $500 \times g$ （1,600 rpm）、4 ）して沈殿させ、上清を捨てる。

備考: 遠心している間に、Protease inhibitor mix tabletを400 μ lの水に溶かす。25 \times のストック溶液となる。使用後は-20 で保存する。

4. Protease inhibitor mix (P.I.) を氷冷したBuffer Dに添加する。調製したP.I.は25 \times である。 3×10^6 細胞の各サンプルに対して100 μ lのBuffer Dと4 μ lのP.I.を添加する。

P.I.-Buffer Dの調製	3×10^6 cells	1×10^7 cells	5×10^7 cells
Buffer D	100 μ l	300 μ l	1,500 μ l
Protease inhibitor mix (P.I.)	4 μ l	12 μ l	60 μ l

備考: その日に必要とされる容量の[P.I. - Buffer D] を準備する（表12参照）。

5. 1×10^6 細胞の各サンプルに対して、30 μ lの調製したてのフレッシュな[P.I. - Buffer D]を添加する（表12参照）。沈殿を[P.I. - Buffer D]にサスペンドする。これは断片化（ステップ 3）のために用意されたクロマチンを含むサンプルである。

表12

細胞のサスペンド	3×10^6 cells	1×10^7 cells	5×10^7 cells
P.I.-Buffer D	90 μ l	300 μ l	1500 μ l

備考: 調製したてのフレッシュなバッファーを使用し、その日に使用しないものは廃棄する。

1つのChIP実験（**ステップ4**）は、 10^6 細胞の断片化クロマチンで行われる。表13にChIP解析用断片化クロマチン調製に必要な細胞数を示す。

表13

IP数	細胞数 / 断片化	P.I.- Buffer Dの量/断片化
1	1×10^6	in 30 μ l
6	6×10^6	in 180 μ l
12	1.2×10^7	in 360 μ l

- 備考：**
- 各ChIP解析は 1×10^6 の細胞を必要とする。スケールは調整する。
 - ネガティブコントロール、ポジティブコントロールを含め、処理するChIPの数を決定する（**ステップ4及び5**）。
 - 断片化されたクロマチンの大部分はChIP実験に使用するが、断片化されたクロマチンの一部（100 μ l）はChIP実験用（**ステップ4及び5**）のインプットサンプルとして必要で、アガロースゲルでもチェックされる（**解析ステップ**）。

ステップ3 - クロマチン断片化

断片化モジュール

備考： このプロトコールは様々な種類の哺乳類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。少量のサンプル（ 3×10^6 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。条件が至適化されたら、**ステップ3**や**解析ステップ**、ついで**ステップ4及び5**に進む。

1. クロマチンを含むサンプルを適切なチューブに移す。
 - 1.5 mlチューブには300 μ l以上入れない。
 - 15 mlチューブには2 ml以上入れない。

備考： いくつかの断片化していないクロマチンを今後のコントロールのためにキープする（**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。サンプルは0 に近い温度に保つ。各サンプルは[30秒 “ON” / 30秒 “ON”]で15サイクル超音波破碎する。トータル時間は15分間である。

備考：

- 上記の断片化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。
- 至適な断片化条件はChIPの効率のために重要である。断片化条件は各細胞タイプや、固定プロトコール、超音波装置に対して至適化されるものである。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、中身を新しい12 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）、4 ）する。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。

備考： ここで、断片化されたクロマチンはその後のChIP実験（**ステップ4**、**ステップ5**）や、断片化効率の解析（**解析ステップ**）の用に保存することができる。

5. インプットサンプル調製のため、1.5 mlチューブに断片化したクロマチン100 μ l（ 3×10^6 細胞相当）づつを分注する。それは**ステップ5-5**に進むまでChIPサンプルと一緒に-20 に置いておくことができる。
6. 250 μ l又は450 μ lの断片化した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、-80 で保存する。断片化したクロマチンを直接ChIPに使用することもできる（**ステップ4**）。

備考：

- ChIPのターゲットによっては、数ヶ月又は数週間の間、クロマチンを液体窒素で保存することもできる。凍結融解しないこと。
- 断片化クロマチンサンプル250 μ lは6 IP用である。
- 断片化クロマチンサンプル450 μ lは12 IP用である。

ステップ4 - 免疫沈降

ChIPモジュール

ビーズ調製：（下記の1~4を一度だけ行う必要がある。）

1. 2 mlの[P.I.-ChIP buffer 1x]を準備する。

備考： 1,520 μ lの水に400 μ lのBuffer E (5 \times ChIP buffer) と80 μ lのP.I.を添加する。

2. キットに入っている pre-blocked protein A/G beadの懸濁液をとる。ビーズを沈殿させるため、遠心（2分間、500 \times g（3,000 rpm））し、上清を除く。
3. ビーズを洗浄するため、1 mlの調製したてのフレッシュな[P.I.-ChIP buffer 1x]をビーズに添加する。再びビーズを沈殿させるために遠心（2分間、500 \times g（3,000 rpm））し、上清を除く。
4. 1:3のビーズ懸濁液となるよう、沈殿させたビーズに415 μ lの[P.I.-ChIP buffer 1x]を添加する。ビーズはクロマチン免疫沈降実験用に調製された状態となる。12~18 IPに直接使用し（次の工程、表14）、4 で保存する。

備考： [beads plus buffer]の最終容量は約620 μ lである。1 IPあたり30 μ lが必要である。

免疫沈降：

5. IPインキュベーションミックスを調製する。次の試薬を混合する。：BSA、P.I.、Buffer E、ビーズ、水。下記に示したように、2タイプのIPインキュベーションミックス調製することができる。：
 - 表14はRed ChIP Kitに入っているTBP抗体でChIP解析を行うためのものである（TBP-ChIP）。
 - 表15はあなたが選んだ抗体でChIP実験を行う場合に当てはまる。IPインキュベーションミックスの調製のために添加される水の容量を調整する（表15参照）。それは1 IPに対して使用する抗体の容量に依存する。

表14

TBP-ChIPの数	IPインキュベーションミックスに含まれる各試薬の量					総量
	5% BSA	P.I.	Buffer E (5 \times ChIP)	IP用ビーズ	水	
1	6 μ l	10 μ l	60 μ l	30 μ l	163.5 μ l	269.5 μ l
3	20 μ l	33 μ l	200 μ l	100 μ l	540 μ l	893 μ l
6	40 μ l	66 μ l	400 μ l	200 μ l	1,080 μ l	1,786 μ l
12	80 μ l	132 μ l	800 μ l	400 μ l	2,160 μ l	3,572 μ l

備考： 使用前にprotein A/G beadsを均一になるように懸濁する。

表15

ChIPの数	IPインキュベーションミックスに含まれる各試薬の量					総量
	5% BSA	P.I.	Buffer E (5×ChIP)	IP用ビーズ	水	
1	6 μl	10 μl	60 μl	30 μl	(164-v.a.) μl	x μl

備考： “v.a.” は、IPインキュベーションミックスに添加される抗体の容量に相当する(この後の9)。したがって、“v.a.”の容量は、IPインキュベーションミックスに添加する水の量から引かれなければならない。
1 ChIPあたりのクロマチンと抗体を含む混合液の最終容量は300 μlである。

6. 各TBP-ChIPのために、1 IPチューブあたり269.5 μlの調製したてのフレッシュなIPインキュベーションミックスを添加する。

備考： 1 ChIPあたり1本のチューブを使用する。これがこのプロトコールにおけるIPチューブに相当する。

7. キットに入っている anti-TBPではなく他の抗体を使用したChIPのために、1 IPチューブあたりx μlの調製したてのフレッシュなIPインキュベーションミックスを添加する(表15)。

備考： - “クロマチン添加なし”のような1つのコンポーネントを除いたコントロールを含むこと。また、細胞タイプの異なる細胞や、インダクションの異なる細胞、処理を受けた細胞も同様にテストされる。

8. そして、1 IPチューブあたり30 μlの断片化クロマチンを添加する(ステップ3-6から)。

9. 最後に、1 IPチューブ対して、anti-TBP 又は興味のある抗体を添加する。：
- キットに入っている抗体 anti-TBP : 1 IPあたり4 μg (0.5 μl) を使用する。
- その他の抗体 : 2~5 μgの抗体(容量は使用する抗体に依存する。)を使用する。

備考： “クロマチン添加なし”のような1つのコンポーネントを除いたコントロールを含むこと。

10. 数回転倒混和し、ローテーターで1晩、4℃でインキュベートする。

備考： 断片化クロマチンのクオリティを解析したい場合、このマニュアルに記されているプロトコールに従うこと(解析ステップ)。

ルート 1: 解析ステップ1、2を1日目に行う。

ルート 2: 解析ステップ1~5は、ChIP解析のために2日目に実施されるステップ(ステップ5-5~15)と同様であることに注目する。; インプットサンプルから調製したDNAは、その後の解析ステップ6と7でアガロースゲルで解析されるために、3日目にさらに処理される。

ステップ5 - DNA精製**ChIPモジュール****ビーズ洗浄とビーズからのDNA溶出 (ChIPサンプル) :**

1. インキュベートした後、遠心 (2分間、 $500 \times g$ (3,000 rpm)、4) してビーズを沈殿させる。上清を穏やかに取り除く。

備考: ビーズを取り除かないように注意する。: ビーズの沈殿の上に少量のバッファーを残す。ビーズは[クロマチン-抗体-ビーズ]複合体(コンプレックス)を分離するために洗浄される。サンプルは冷やしておく。洗浄ステップは低温で行うことを推奨する。そして、Buffer Fを室温に置く。

2. 次のようにして、ビーズ洗浄に進む。1 IPチューブあたり350 μ lの氷冷した洗浄バッファーを添加する。回転させながら5分間インキュベートする。遠心(2分間、 $500 \times g$ (3,000 rpm)、4) してビーズを沈殿させる。穏やかに上清を除く。前述したような洗浄を繰り返す。洗浄には次のバッファーを使用する。

- Wash buffer-1で、洗浄2回
- Wash buffer-2で、洗浄1回
- Wash buffer-3で、洗浄1回
- Wash buffer-4で、洗浄2回

備考: 各洗浄ステップの後、沈殿をかき乱さずに、できるだけ多くのバッファーを取り除くように試みる。最後の洗浄の後には、バッファーを最後まで慎重に取り除く。

3. 400 μ lのBuffer F (あらかじめ室温に置いておいた溶出バッファー)を沈殿させたビーズに添加し、ビーズに結合している[DNA-タンパク-抗体]コンプレックスを溶出する。回転させながら室温で20分間インキュベートする。

4. 遠心 (2分間、 $500 \times g$ (3,000 rpm)、室温) してビーズを沈殿させる。上清を新しいキレイな1.5 mlチューブに移す。これはIPで分離されたDNAを溶出することに相当する。

備考: ChIPサンプルと同じ数のIPチューブがある。

5. 最終容量を400 μ lにするために、300 μ lのBuffer F (室温の溶出バッファー)を100 μ lの断片化したクロマチンサンプル(ステップ3-5から)に添加する。それがインプットサンプルに相当する。

備考: - ここから、ChIPサンプルとインプットサンプルと一緒に処理する。
- ステップ3-5のフレッシュな断片化クロマチン、又は溶かしたもののいずれかを使用する。

ChIPサンプル及びインプットサンプルからのDNAの回収と精製 :

6. キットに入っている5M NaClを16 μ l添加、混合し、クロスリンクを外すため、サーモシエーカーで65 で4時間インキュベートする。

備考: できれば、オーバーナイトでクロスリンクを外す。

7. サンプルを室温に冷まし、400 μ 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、5秒間激しくボルテックスする。

備考: 遠心する前に、できればローテーターで、10分間、室温でサンプルをインキュベートする。

8. 遠心 (2分間、14,000 \times g (13,000 rpm)、室温) する。上層 (水層) を新しい1.5 mlチューブに移す。

9. 400 μ lのクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1)を添加し、5秒間激しくボルテックスする。

備考: 遠心する前に、できればローテーターで、10分間、室温でサンプルをインキュベートする。

10. 遠心 (2分間、14,000 \times g (13,000 rpm)、室温) する。上層 (水層) を新しい1.5 mlチューブに移す。

11. 1 チューブあたり : キットに入っているDNA co-precipitant 5 μ lと、DNA precipitant 40 μ lを添加する。次に、1 mlの100%エタノールを添加する。よく混ぜる。-20 $^{\circ}$ Cに30分間静置する。

12. 遠心 (25分間、14,000 \times g (13,000 rpm)、4 $^{\circ}$ C) する。慎重に上清を除き、500 μ lの氷冷した70%エタノールを沈殿に添加する。

13. 遠心 (10分間、14,000 \times g (13,000 rpm)、4 $^{\circ}$ C) する。慎重に上清を除き、残ったエタノールを蒸発させるために室温に30分間 風乾させる (蓋を開けておく)。
沈殿は : 1/断片化されたクロマチンから精製されたDNA (インプットサンプル) と2/ChIPによって分離されたDNA (ChIPサンプル) である。

備考: - チューブ壁に残っているエタノールを除く。
- インプットサンプルとして使用した断片化クロマチンは、ChIPアッセイに使用した断片化クロマチンと同じ調製のものでなければならない。

14. 200 μ lの水をChIPサンプルに添加する。インプットサンプルには、100 μ lの水を添加する。

15. 沈殿を溶かすため、チューブを30分間、12,000rpmの室温のシェーカーに置く。

備考: 均一な溶解のために、DNAを振とうする。

備考: 断片化クロマチンのクオリティーを解析したい場合、このマニュアルに記されているプロトコールに従うこと (解析ステップ)。

ルート1 : 解析ステップ3~7は、2日目に行う。

ルート2 : 解析ステップ1~5は、ChIP解析のために2日目に実施されるステップ (ステップ5-5~15) と同様であることに注目する。 ; インプットサンプルから調製したDNAは、その後の解析ステップ6と7でアガロースゲルで解析されるために、3日目にさらに処理される。

ステップ6 - 定量PCR

定量PCRモジュール

備考: クロマチン免疫沈降で得られるDNAは極めて少量であるので、特異的プライマーを使った定量PCRで増幅する。PCRサイクルの間に生成される二本鎖DNAの量は、インターカレート色素 (SYBR Green) の蛍光によって定量される。信頼できる定量結果を得るために、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バッファーミックスを氷上で溶かす。
2. バッファーミックスに水を加える。1 PCRサンプルあたり : 5.5 μ lの水を12.5 μ lのバッファーミックスに加える。10秒間ボルテックスする。

備考: バッファーミックスは、IQ SYBR Green supermixやあなたの研究室で使用している他のものを使える。あなたの試薬メーカーの指示に従う。

3. 1 PCRサンプルあたり : 2 μ lのpair primerセットを添加する。

備考: 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) の両方のプライマーを含む混合液として供給され、終濃度は各5 μ Mである。

4. インプットサンプルを水で1:25に希釈したものを調製する (ステップ5-15で調製)。ボルテックスで5秒間混合する。

備考: 希釈されたインプットDNAサンプルは、1 μ lあたり終濃度で1,000~1,500細胞のインプットDNAに相当する。

5. 1 PCRサンプルあたり : 5 μ lのDNAサンプルを添加する。
 - ChIPサンプルから (ステップ5-15で調製)
 - インプットサンプルから (ステップ 6-4で調製された1:25希釈)

表16

1 PCRサンプルあたり :			
定量PCRバッファーミックス	水	Primer pairs	DNA
12.5 μ l	5.5 μ l	2 μ l	5 μ l

6. 下の表に示した条件 (サイクルと温度) でPCRを行う (Red ChIP Kitを使った実験例、図2及び図3参照)。

表17

	温度	時間	サイクル
PCR増幅	95	3分間	× 40
	95	15秒間	
	60	45秒間	
	95	1分間	× 1
融解曲線	65 で1サイクルにつき 0.5 ずつ上昇	1分間	× 60

定量PCR 備考：

- Red ChIP Kitに入っている全てのprimer pairsを使用するために、これらの最適化された定量PCRパラメーターを推奨する。
- それぞれの二本鎖DNAはそれ自身の特異的な融解温度 (T_m) を持っており、それは50%のDNAが一本鎖になる温度と定義される。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かめる。

プライマー設計

- プライマーのセルフ-コンプリメントリー及び二次構造は、プライマーデザイン(http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)でテストできる。PCRプライマーのためには、60 のアニーリング温度が推奨される。
- 短いDNA断片の増幅長 (50-100bp) はPCR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は2~3 を超えないほうがよい。
- 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 RCR (<http://genome.cse.ucsc.edu/cgi-bin/hqPcr>) でテストする。プライマーはゲノムから唯一のDNA産物を増幅するべきである。
- 定量PCRのすべてのプライマーセットをインプットDNAの10倍連続希釈系列を使ってテストする。プライマーセットの増幅効率 (AE) を計算式で算出する (7)。

$$AE = 10^{-1 / \text{傾き}}$$

信頼性の高い増幅ファクターは2である。問題がない場合でも、違うブランドの定量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。いくつかの重要なアドバイスが下記で与えられる。

備考：

バックグラウンドの決定：

ChIPの最終ゴールは、同一ChIPサンプルにおけるその高さを算定することである。： 1/特異的なDNA断片 (興味のあるタンパクの結合部位に相当する) と、2/関連性のないゲノム領域 (すなわちバックグラウンド) との比較。ゲノム領域のバックグラウンドは、興味のあるタンパクの結合部位から遠く離れて (最低でも数 1 000 bp) 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レベルを確認するために、ゲノムの異なる部分のいくつかの遺伝子座をテストすることを推奨する。例えば、このキットでは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が選択されている。なぜなら、この遺伝子は組織-特異的で、その遺伝子座は大部分の細胞系で転写的にサイレントだからである。

データの解釈：

特定のゲノム上の遺伝子座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 (インプットの%、回収の%) として定量PCRのデータから計算することができる。

$$\% \text{ Input} = AE^{Ct \text{ Input} - Ct \text{ ChIP}} \times Fd \times 100\%$$

このAEは先に計算した増幅効率である (7) 。 ; Ct^{ChIP} と Ct^{Input} 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 ; Fdは定量PCRに使ったインプットDNAとChIPサンプルの量差のバランスをとる希釈補正ファクターである。

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。

$$\text{Occupancy} = \% \text{ Input (特定の遺伝子座)} / \% \text{ Input (バックグラウンドの遺伝子座)}$$

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一般的に使われる。 ; それは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と比較して約10倍高い結果を生じ、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。

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。

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

$\text{Ct}_{\text{NegChIP}}$ 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 (8)。

解析ステップ - 断片化したクロマチンの解析

備考: 下記1~5はステップ5-5~15と全く同じである。

1. 断片化したクロマチンをアガロースゲルで解析するために、100 μ lの断片化したクロマチン(ステップ3-5)をとる。

備考: - 100 μ lの断片化したクロマチン 1サンプルは約 3×10^6 細胞から得られたクロマチンに相当する。
- 同じように断片化していないクロマチンをアガロースゲルで解析することができる。

2. 300 μ lのBuffer F (あらかじめ温めておいた溶出バッファー) と16 μ lのキット添付の5M NaClを添加し、クロスリンクを外すためにサーモシェーカーで4時間、65 °Cで、インキュベートする。(オーバーナイトでのインキュベートも可。)

3. 室温に冷ます。フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール抽出でDNAを回収する。冷たい100%エタノール、co-precipitant、precipitantを添加してDNAを沈殿させる。-20 °Cでインキュベートする。(ステップ5-6~11)

4. 沈殿を70%エタノールで洗浄し、風乾する。(ステップ5-12~13)

5. 沈殿を100 μ lの水にサスペンドする。これは断片化されたクロマチンから精製されたDNAに相当する。80 μ lを新しいチューブにキープする。(ステップ5-14~15)

備考: - ChIPをその断片化したクロマチンで行った場合、このDNAサンプルはステップ5-15で得られたインプットサンプルに相当する。
- DNAのサンプルは4 °Cで保存できる。(又は-20 °Cで長期間保存できる。)

6. 20 μ lのDNAサンプルをRNaseで次のように処理する。20 μ lの分離したDNAに4 μ lのRNase-DNase free (0.5 μ g/ μ lストック溶液)を加える。37 °Cで30分間インキュベートする。

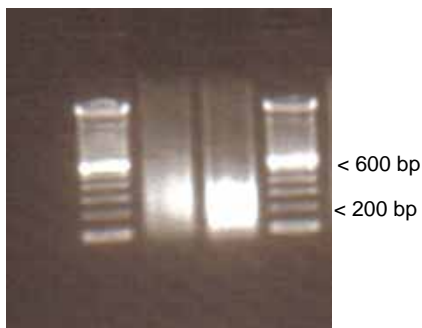
備考: 調製したてのフレッシュなもの(上記5)ではなく4 °Cや-20 °Cに保存しておいた20 μ lのDNAを使う場合、6に進む前に、サンプルを65 °Cのサーモシェーカーで10分間インキュベートする。

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する。各サンプル1.5 μ l及び3 μ lを解析する(結果セクションの図1参照)。

Red ChIP Kitを使った実験例：転写因子ChIP

図1（断片化したクロマチンの解析）：

断片化モジュール



DiagenodeのBioruptor™とRed ChIP Kitの断片化モジュールで得られた断片化したクロマチンのアガロースゲル解析。

U2OS細胞は1%ホルムアルデヒドで固定（室温10分間）される。クロマチン断片化の前に、30 μ lのLysis bufferあたり 10^6 細胞がサスペンドされる。それぞれのサンプルは1.5 mlチューブあたり 5×10^6 の細胞からなっている。

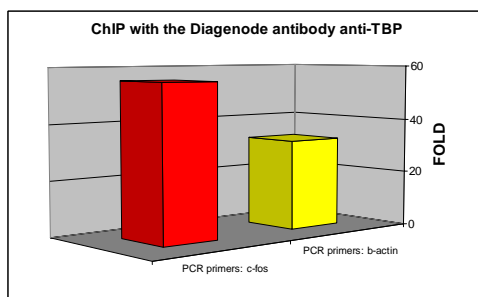
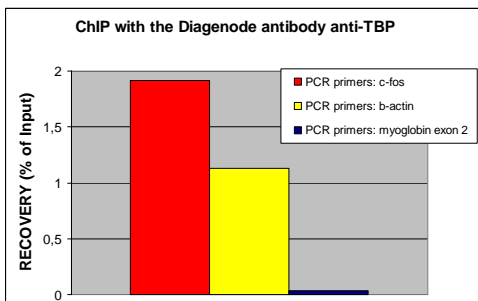
サンプルはDiagenodeのBioruptor™で[30秒間オン/30秒間オフ]で15サイクル超音波処理される。サンプル1と2は同じものである。断片化したクロマチンは、クロスリンクの解除、DNA精製、RNase処理を施される。そしてサンプルは1%アガロースゲルで解析される。図に示したように2つの量の断片化したクロマチンが解析される（1.5 μ lと3 μ l）。

レーン1及び4は、100bp DNA分子量マーカーである。

備考：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（[解析ステップ](#)）。

図2 (ChIPの結果 : 定量PCR) :

Red ChIPの4つのモジュール



転写因子ChIP効率の解析

TBP抗体を含む転写因子ChIPのためのDiagenodeのRed ChIP Kitで得られたChIPの結果。

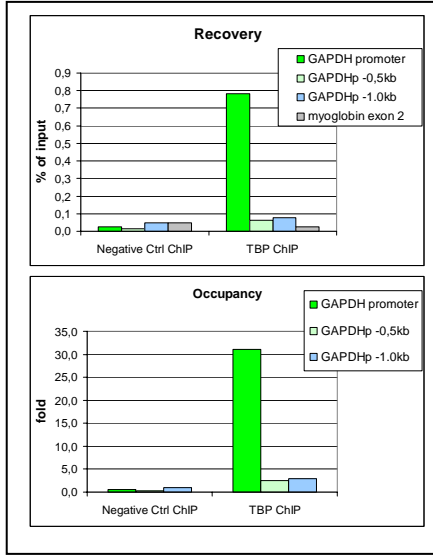
ChIP解析は、U2OS細胞、Diagenodeのantibody direct against TBP、定量PCR用に至適化されたPCRプライマーを使って行われた。

TBPによる、c-fosとb-actinプロモーターの Occupancy は、免疫沈降されたDNAの定量PCR解析の蛍光からはっきりとわかる。IPとPCRの特異性のコントロールは、myoglobin exon 2用プライマーを含む。Red ChIP のコントロールは高いChIP効率を示す。

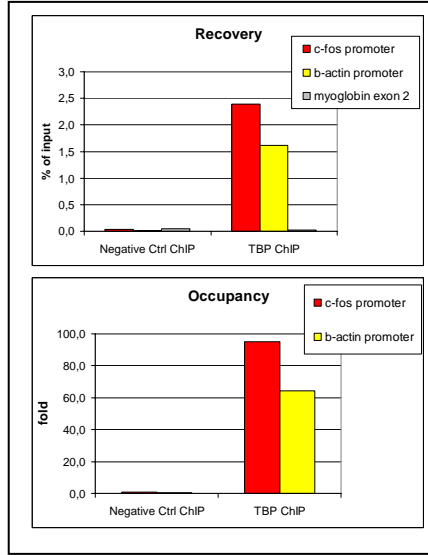
図3 (ChIPの結果: 定量PCR) :

Red ChIPの4つのモジュール

A:



B:



転写因子ChIPの分離と効率の解析

TBP抗体を含む転写因子のためのDiagenodeのRed ChIP Kitで得られたChIPの結果。

ChIP解析は、U2OS細胞、Diagenodeのantibody directed against TBP、定量PCR用に至適化されたPCRプライマーを使って行われた。ChIP解析にはネガティブコントロール(抗体無添加)が含まれた。

A : TBPによる、GAPDHプロモーターのOccupancy。高いChIP分離。

B : TBPによる、c-fosとb-actinプロモーターのOccupancy。

TBPによる、3つのプロモーターのOccupancyは、免疫沈降されたDNAの定量PCR解析の蛍光からはっきりとわかる。IPとPCRの特異性のコントロールには、myoglobin exon2のみならず、GAPDH (プロモーター-0.5 kb)、GAPDH (プロモーター-1kb) も含まれる。Red ChIPのコントロールは高いChIP効率同様、高いChIP分離効率を示す。

5. トラブルシューティングガイド

批評ステップ	トラブル	解決方法
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、正確な温度と正しい濃度のホルムアルデヒド濃度で行っているかを確認する。高品質なホルムアルデヒドを使う。
	クロスリンクが強すぎる。	
	タンパク質にはDNAに作用する特異的な方法がある。いくつかのタンパク質はDNAに直接結合していないが、他のDNA結合タンパクと一緒に作用する。	短すぎる又は長すぎるクロスリンク時間は、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、最適なクロスリンク時間を見つけるべきである。
	in vivoでのタンパク質とクロマチンの効果的な固定は、ChIPにおいてきわめて重要なステップである。おそらく、クロスリンクの程度が最も重要なパラメーターである。	その後の免疫沈降ステップに関して2つの主要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を生じたり、クロマチンの有効な抗原を減少させる。2/ホルムアルドと抗原エピソードの相対的な感度。慎重にクロスリンクを行うことが重要である。
細胞の溶解	細胞が完全に破碎されていない。	Lysis bufferの量に対して、過剰な細胞を使用しない。マニュアルのプロトコールに従う。
細胞数	ChIP実験に要求される細胞の量は、細胞系、興味のあるタンパク質、使用した抗体によって決まる。	1 ChIPあたり10 ⁶ 細胞を使用することを推奨する。10 ⁶ 細胞より少量で良好な結果がもたらされる場合もある。1 ChIPあたり最大で5 × 10 ⁶ 細胞でも使用できる。
クロマチン断片化	バッファー組成	キットに入っているバッファーを使用する。それらは重要なキートンボネントに最適化されている。サンプルは冷やしておく。
断片化DNAの高品質な写真	DNA断片の正確なサイズ決定のために。	クロスリンクを外し、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。100 µlの断片化したクロマチンを300 µlのBuffer Fと混ぜ、65 °Cで最低4時間インキュベートする。(最低4時間、最高一晩。)
	アガロースゲル上での多量のDNAの移動は、真のDNAの断片化を反映しない悪い写真になる。	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 µg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	1%より濃いアガロースゲルを使わず、ゆっくり泳動する。
	泳動バッファー濃度	アガロースゲル上でスミアに導く0.5 × TAEより、1X TAE 又は0.5 × TBEの使用が好ましい。
免疫沈降 (IP) のビーズ	ビーズの遠心と保存	高速でビーズを遠心しない。マニュアルのプロトコールに記載したようなおだやかな遠心 (500 × g、2~3分間) を使用する。 $g = 11.18 \times r \times (\text{rpm} / 1,000)^2$; rは回転半径 (mm)。1.5 mlチューブで1,000 ~ 2,000 × gの遠心は可能である。
	ビーズの保存	4 °Cで保存する。凍結厳禁。
	ビーズの結合能力	ウサギとヤギ：ポリクローナル抗体 ; ヒト：IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 ; マウス：IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA ; ラット：IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c.
免疫沈降 (IP) の抗体	どうして自分の抗体はChIPで使えないのか？	抗体-抗原認識は、エピトープへの近づきやすさや、認識の損失に帰着するクロスリンクステップにより重大な影響を受ける。
	どの抗体をChIPで使うべきか？	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。
	どのようにしてChIP抗体を選ぶのか？	抗体のクロスアクティビティ (交差性) を確認する。ウエスタンブロット解析で抗体の特異性を実証する。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上げることに使用できる。
	ChIPに使用する抗体量は？	効果的なIPを確実にするために、クロマチンの量と抗体の量の最適な

		比を知っておくことが重要である。 抗原の特異性が低い又はターゲットタンパク質の存在量が多い場合（例えばヒストン）には、多量の抗体（又は少量のクロマチン）が要求される。 抗体の欠乏がChIP効率の低い結果となるのに対して、大過剰の抗体は低い特異性に至るかもしれない。
	自分の抗体はprotein A又はprotein Gに結合しますか？	protein A又はGと異なるイムノグロブリンのタイプでは、アフィニティーに有意な差がある。 例えば、IgM、IgY、又はIgG ₁ は、protein A又はGと結合するような二次抗体を要求する。
PCR	プライマー	長さ：18～24ヌクレオチド T _m ：60（+/- 3.0） % GC：50%（+/- 4）
	コントロール:	ネガティブ PCRコントロール：ChIPに使用した興味のある抗原が存在しないDNA領域に特異的なプライマーでのPCR。 ポジティブ PCRコントロール：インプットでPCR。
	Red ChIPの定量PCRプライマーペア	キットに入っているPCRプライマーはヒトの遺伝子座をターゲットにしている。
	Red 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（GAPDH、c-fos、b-actin）を増幅するRed ChIP定量PCR特異的プライマーペアを使用する。
	Red ChIPの定量PCRプライマーはChIPの分離とクロマチン断片化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。ChIP解析における分離を評価するために、GAPDHのプロモーター領域から離れた領域（GAPDH-0.5kb、GAPDH-1.0kb）を増幅するための、Red ChIP Kit特異的プライマーペアを使用する。
凍結	サンプルはプロトコルのいくつかのステップで凍結できる。	ステップ3-5及び6（断片化したクロマチン） ステップ5-15（ChIP及びインプット：DNA） 解析ステップ5（インプット：DNA）
	凍結/融解をさける。	細胞は瞬間凍結し、氷上で溶かす。
ChIPの分離	どのようにして、私のChIP解析の分離を推定することができるか？	Red ChIP Kitに入っている3つのGAPDHプライマーを使用する。 TBPの直接の結合部位がPCRで増幅したDNA領域に含まれるので、GAPDH遺伝子のプロモーターのTATA結合ボックスは、抗TBP抗体のChIPで最高量を示すはずである。 GAPDHプロモーターから離れた0.5kbと1kbのDNA領域は量的に有意な減少（>10倍）を示すはずである。 それはまた、クロマチンの断片化が適切に実施されたことを示している。

6. 参考資料

1. Kuo MH, Allis CD. *Methods*. 1999 (3):425-33.
2. Orlando V., Strutt H. and Paro R. *Methods*. 1997; 11(2):205-14.
3. Ren B., Robert F., Wyrick J.J., Aparicio O., Jennings E.G., Simon I., Zeitlinger J., Schreiber J., Hannett N., Kanin E., Volkert T.L., Wilson C.J., Bell S.P. and Young R.A. *Science*. 2000; 290(5500):2306-9.
4. Ballestar E., Paz M.F., Valle L., Wei S., Fraga M.F., Espada J., Cigudosa J.C., Huang T.H., Esteller M. *EMBO J*. 2003; 22(23):6335-45.
5. Le Guezennec X., Brinkman A.B., Vermeulen M., Denissov S.G., Gazziola C., Lohrum M.E., Stunnenberg H.G. *BJU Int*. 2005; 96 Suppl 2:16-22
6. Mardis E.R. 2007 *Nat Method* 4(8):613-4
7. Pfaffl MW. 2001 *Nucleic Acids Res*. 29(9):e45.
8. 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., 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
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/>