

Red ChIP Kit 簡易プロトコル (version 01)

詳細については Instruction Manual (英文、又は日本語訳) を参照

(Code No. 310-80471)

キット内容 (18 回分)

断片化モジュール (ステップ 1~3)

内容	容量	保存温度
Buffer A (細胞回収)	10 ml	4
1.25 M glycine	10 ml	4
Buffer B (溶解1)	30 ml	4
Buffer C (溶解2)	30 ml	4
Buffer D (クロマチン断片化) *	3 ml	4

* : 白色の沈殿が析出した場合は、室温において沈殿を溶かしてからご使用ください。

抗体モジュール (ステップ 4)

内容	容量	保存温度
Antibody anti TBP (抗ヒトTBP抗体)	10 µl	-20

ChIPモジュール (ステップ 4~5)

内容	容量	保存温度
Buffer E (5 × ChIP)	5 ml	4
Protease inhibitor mix (P.I.) *	1 タブレット	-20
pre-blocked protein A/G coated beads	630 µl	4 (凍結厳禁)
5% BSA	200 µl	-20
Wash buffer - 1	15 ml	4
Wash buffer - 2	9 ml	4
Wash buffer - 3	9 ml	4
Wash buffer - 4	15 ml	4
Buffer F (溶出)	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

* : タブレットを400 µl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 6)

(定量PCR用Primer Pair)		
内容	容量	保存温度
GAPDH-promoter primer pair	50 µl	-20
GAPDH p-0.5 kb primer pair	50 µl	-20
GAPDH p-1.0 kb primer pair	50 µl	-20
c-fos promoter primer pair	50 µl	-20
b-actin promoter primer pair	50 µl	-20
Myoglobin exon 2 primer pair	50 µl	-20

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 µg/ µl)
- ・ アガロース
- ・ TAEバッファー
- ・ DNA分子量マーカー

装置

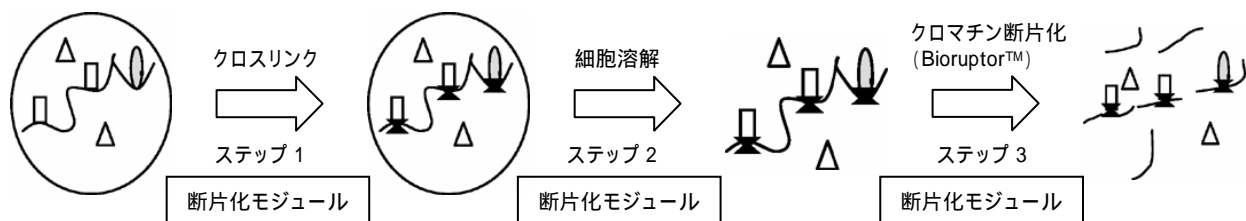
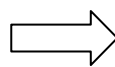
- ・ 冷却遠心機 (1.5 ml用)
- ・ 遠心機 (15 ml 及び 50 ml チューブ用)
- ・ 振とう台
- ・ セルカウンター
- ・ 密閉式超音波細胞破碎装置 Bioruptor™ *
- ・ ローテーター
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ サーマシェーカー (65)
- ・ 微量遠心機とローテーターのある低温室
- ・ リアルタイムPCR装置
- ・ アガロースゲル電気泳動装置

* : Bioruptor™はコスモ・バイオから販売されています。

RedChIP 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	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
ステップ 4 (免疫沈降)	1日目	1晩
ステップ 5 (ビーズ洗浄)	2日目	1.5時間
ステップ 5 (DNA精製)	2日目	6.5時間 ~ 1晩
ステップ 6 (定量PCR)	3日目	3時間

キットの概要

抗体添加
Protein A/G beads添加

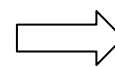
ステップ 4



免疫沈降

ステップ 4

ビーズ洗浄 / 脱クロスリンク



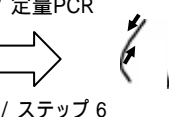
ステップ 5



DNA精製 / 定量PCR



ステップ 5 / ステップ 6



抗体モジュール

ChIPモジュール

ChIPモジュール

ChIPモジュール

ChIPモジュール

定量PCRモジュール

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 スクレーピング法>

クロスリンクバッファーを準備する。
詳細はInstruction Manual Table 3(表3)参照

3 × 10⁶細胞の場合：
37%ホルムアルデヒド 90 μl, Buffer A 210 μl, PBS 3 ml

培養細胞 *

ディッシュ又はフラスコから培地を除く
クロスリンクバッファー添加 (3 × 10⁶細胞に対して約 3 ml)
すばやく混合する。
インキュベート(10分間、室温) (クロスリンクステップ)**
1.25M glycine 1/10量添加 (3 × 10⁶細胞に対して約 300 μl)
混合し、インキュベート(5分間、室温) (クロスリンク反応停止)
バッファーを除く
氷冷した PBSで洗浄 (3 × 10⁶細胞に対して5 ml)
バッファーを除く
氷冷した PBSで洗浄 (3 × 10⁶細胞に対して5 ml)
バッファーを除く
氷冷したBuffer B 添加 (3 × 10⁶細胞に対して500 μl)
スクレーピング
新しいコニカルチューブに移す。

ステップ 2へ

* : 上記プロトコールは接着細胞の場合。浮遊細胞を使用する場合は、Instruction Manual 1-a 備考を参照。

** : クロスリンクの条件は、細胞の種類や、ターゲットとするタンパク質によって異なるので、条件を至適化することが望ましい。詳細についてはInstruction Manualを参照。

<ステップ 1-b トリプシン処理法>

PBS、培地、トリプシンを温めておく。

培養細胞

培地を除く
温めておいたPBSを添加 (3 × 10⁶細胞に対して3.5 ml)
振とう(2分間)
PBSを除く
トリプシン-EDTA 添加 (3 × 10⁶細胞に対して1 ml)
1分後、細胞がフラスコの底から剥がれたことを確認。
培地添加(トリプシン不活性化) (3 × 10⁶細胞に対して2 ml)
細胞をバラバラにして、15 ml 又は 50 mlのコニカルチューブに移す。
細胞をカウントする。
遠心(10分間、500 × g(1,600 rpm)、室温)し、上清を除く。

沈殿(細胞)

培地添加 (3 × 10⁶細胞に対して600 μl)

クロスリンクバッファーを準備する。
詳細はInstruction Manual Table 10(表10)参照
3 × 10⁶細胞の場合：
37%ホルムアルデヒド 20 μl, Buffer A 45 μl

クロスリンクバッファー添加
穏やかに回転させながら、インキュベート(10分間、室温) (クロスリンクステップ)
1.25 M glycine 1/10量添加 (3 × 10⁶細胞に対して66 μl)
均一に混合する (クロスリンク反応停止)
遠心(5分間、500 × g(1,600 rpm)、4)し、上清を除く。

沈殿(細胞)

氷冷した PBS で洗浄 (3 × 10⁶細胞に対して900 μl)
上下に数回ピペッティング

沈殿(細胞)

遠心(5分間、500 × g(1,600 rpm)、4)し、上清を除く。
氷冷した Buffer B にサスペンド (3 × 10⁶細胞に対して900 μl)
上下に数回ピペッティング
穏やかに混合しながら、インキュベート(10分間、4)

ステップ 2へ

ステップ 2 - 細胞溶解

固定した細胞(ステップ 1から)

遠心(5分間、500 × g(1,600 rpm)、4)し、上清を除く。

沈殿

氷冷した buffer C 添加 (3 × 10⁶細胞に対して900 μl)
上下に数回ピペッティング
穏やかに混合しながら、インキュベート(10分間、4)

遠心(5分間、500 × g(1,600 rpm)、4)し、上清を除く。

沈殿

Protease Inhibitor mix (P.I.)を氷冷したBuffer Dに添加する。
3 × 10⁶細胞の場合： Buffer D 100 μl, P.I. 4 μl

[P.I. Buffer D] 添加 (3 × 10⁶細胞に対して90 μl添加)

サスペンド (断片化用クロマチンサンプル)

ステップ 3へ

ステップ 3 - クロマチン断片化

断片化用クロマチンサンプル(ステップ 2から)

チューブに移す
1.5 mlチューブの場合： 300 μl 以下
15 mlチューブの場合： 2 ml以下

断片化 (Bioruptor™を使用)
[30秒間 ON / 30秒間 OFF] × 15サイクル (0)

遠心(5分間、14,000 × g(13,000 rpm)、4)

上清(断片化クロマチン)

100 μl
250 μl (450 μl) ずつ冷凍したチューブに分注する。
インプット
サンプル用

1 IPあたり30 μlの断片化クロマチンを使用する。
250 μl(6 IP用)、450 μl(12 IP用)
液体窒素で瞬間凍結し、-80 で保存する。
すぐに使用する場合は、そのまま使用する。

ステップ 4へ

< ビーズ調製 >

[P.I. ChIP buffer 1 ×] 2mlを調製する。
水 1,520 μl, Buffer E(5 × ChIP) 400 μl, P.I. 80 μl

Pre-blocked protein A/G beads

遠心(2分間、500 × g(3,000 rpm))し、上清を除く。

沈殿(ビーズ)

[P.I. ChIP buffer 1 ×] 1 ml添加

遠心(2分間、500 × g(3,000 rpm))し、上清を除く。

沈殿(ビーズ)

[P.I. ChIP buffer 1 ×] 415 μl添加

IP用 ビーズ (4 保存)

< 免疫沈降 >

IPインキュベーションミックスを調製する。
詳細はInstruction Manual Table14, 15(表14, 15)参照
1 IPあたり : 5% BSA 6 μl, P.I. 10 μl, Buffer E(5 × ChIP) 60 μl, IP用ビーズ 30 μl, 水 (164-v.a.) μl
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。
(キットに添付のanti-TBPを使用する場合は、v.a. = 0.5 μl)

IPインキュベーションミックス 269.5 μl

(興味のある抗体を使用する場合は(270 - v.a.) μl)

断片化クロマチン30 μl (ステップ 3から)

Antibody anti TBP 0.5 μl 添加

(又は興味のある抗体2 ~ 5 μg 添加)

転倒混和

ローテーターでインキュベート(1晩、4)

遠心(2分間、500 × g(3,000 rpm)、4)し、上清を除く。

沈殿(ビーズ)

氷冷した Wash buffer 1 350 μl添加

ローテーターでインキュベート(5分間、4)

遠心(2分間、500 × g(3,000 rpm)、4)し、上清を除く。

沈殿(ビーズ)

氷冷した Wash buffer 1 350 μl添加

ローテーターでインキュベート(5分間、4)

遠心(2分間、500 × g(3,000 rpm)、4)し、上清を除く。

沈殿(ビーズ)

氷冷した Wash buffer 2 350 μl添加

ローテーターでインキュベート(5分間、4)

遠心(2分間、500 × g(3,000 rpm)、4)し、上清を除く。

沈殿(ビーズ)

氷冷した Wash buffer 3 350 μl添加

ローテーターでインキュベート(5分間、4)

遠心(2分間、500 × g(3,000 rpm)、4)し、上清を除く。

沈殿(ビーズ)

氷冷した Wash buffer 4 350 μl添加

ローテーターでインキュベート(5分間、4)

遠心(2分間、500 × g(3,000 rpm)、4)し、上清を除く。

沈殿(ビーズ)

室温に温めておいた Buffer F 400 μl 添加

ローテーターでインキュベート(20分間、室温)

遠心(2分間、500 × g(3,000 rpm)、室温)

上清 ([DNA タンパク質 抗体] コンプレックス、ChIP サンプル)

断片化クロマチン 100 μl (ステップ 3から)

室温に温めておいた Buffer F 300 μl 添加

インプットサンプル

ChIP サンプル(又はインプットサンプル) (400 μl) (ステップ 4から)

5M NaCl 16 μlを添加し、混合する。

サーモシェーカーでインキュベート(4時間 ~ 1晩、65)
(脱クロスリンク)

室温に冷ます

フェノール / クロロホルム / イソamilアルコール 400 μl 添加
ボルテックス(5秒間)

遠心(2分間、14,000 × g(13,000 rpm)、室温)

上層(水層)

クロロホルム / イソamilアルコール 400 μl 添加
ボルテックス(5秒間)

遠心(2分間、14,000 × g(13,000 rpm)、室温)

上層(水層)

DNA co-precipitant 5 μl 添加

DNA precipitant 40 μl 添加

100% エタノール 1 ml を添加し、よく混合する。

インキュベート(30分間、-20)

遠心(25分間、14,000 × g(13,000 rpm)、4)し、上清を除く。

沈殿

70% エタノール 500 μl

遠心(10分間、14,000 × g(13,000 rpm)、4)し、上清を除く。

沈殿

風乾(30分間、室温)

H₂O 200 μl (インプットサンプルは 100 μl)

振とう(30分間、室温)

精製DNA

(ChIPサンプル、インプットサンプル)

ステップ 6 - 定量PCR

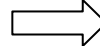
定量PCRについての詳細はInstruction Manualを参照

反応液 (1反応)

バッファミックス	12.5 μl
Primer pair	2.0 μl
H ₂ O	5.5 μl
DNAサンプル	5 μl
トータル量	25 μl

サイクル条件

95	3分間	} × 40サイクル
95	15秒間	
60	45秒間	



データ解析へ

検出

SYBR Green

解析ステップ 断片化したクロマチンの解析

解析ステップの詳細についてはInstruction Manualを参照

インプットサンプルの DNA 20 μl

↓ RNase-DNase free (0.5 μg/μl) 4 μl

↓ インキュベート(30分間、37)

1.5 μl及び3 μlを、1% アガロースゲルで電気泳動する。