

ChIP用 断片化クロマチン調製キット Shearing ChIP Kit™

NIPPON GENE Code No. 317-80481
(Diagenode Catalog #: kch-shchro-040)

使用マニュアル (日本語版 第 1.01 版)

このマニュアルは、Diagenode 社の Shearing ChIP Kit に添付されている Instruction Manual をもとに、ニッポンジーンで作成しました。

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わないください。

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 6
キット内容	p 6
本品以外に必要な試薬・装置	p 6
4. キットのアッセイプロトコール	p 7
スターティングマテリアル-培養細胞	p 7
キットプロトコール：ステップ 1 - 細胞の固定と回収	p 8
ステップ 2 - 細胞の溶解	p 9
ステップ 3 - クロマチン断片化	p 9
ステップ 4 - 断片化クロマチンの解析	p 10
ChIP用 断片化クロマチン	p 10
5. トラブルシューティングガイド	p 11
6. 参考資料	p 12
7. お問い合わせ	p 12

1. はじめに

DiagenodeのShearing ChIP Kitは、ChIP用 断片化クロマチンの調製キットで、簡単で再現性の高いクロマチンの断片化メソッドを提供しています。

クロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析を成功させるためには、高品質の断片化クロマチンを取得が必要ですが、クロスリンクしたクロマチン (タンパク質-DNA) の断片化条件を至適化は容易ではありません。Shearing ChIP Kitは、速く、使い易く、そして最良の結果を得るために至適化されたプロトコールを提供しています。

ChIPメソッドは、*in vivo* におけるタンパク質-DNA 相互作用の研究に用いられており、クロマチンの構造の変化、転写因子や補レギュレーターの調節、その他のエピジェネティックな変化の研究に応用されています (Kuo と Allis, 1999)。

ChIPメソッドの第1ステップは、ホルムアルデヒド固定後のクロマチンの単離と断片化です。そしてその後で、1) 興味のあるタンパク質に対する抗体を使ったクロマチン断片の特異的な免疫沈降と、2) 免疫沈降したDNAの解析の、2つのステップが続きます。

このキットは、あなたに良い結果を提供するために、ChIPメソッドの最初のステップを請け負っています。

DiagenodeのShearing ChIP Kitが、ChIP成功の鍵となります。至適化されたユーザーフレンドリーなこのキットで、ChIP用 断片化クロマチン調製の最良の方法を見つけてください。

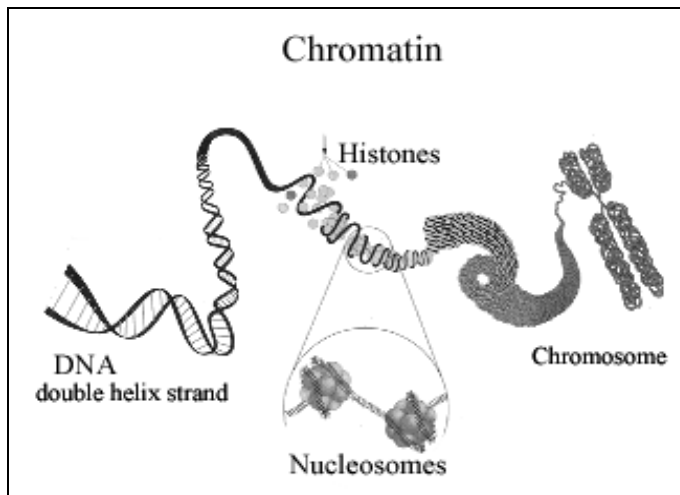


図1: クロマチンの描写

クロマチンは細胞核の一部で、動物や植物の細胞においては、すべての核DNAがそこに含まれています。クロマチン上のDNAはヌクレオソームのまわりに巻きついていて、2コピーのヒストンタンパク質が八量体を形成し、そこに145~147 bpのDNAが巻きつき、ヌクレオソームコアを形成しています。ヌクレオソームは、核内のDNAのパッケージング要素としての主な役割において、主にDNAへの近づきやすさを決定しています (Luger 他、1997)。

2. キットの概要

Diagenode の Shearing - ChIP Kit には、高品質な断片化クロマチンを調製するための最適化されたバッファーと、ユーザーフレンドリーなプロトコールが含まれています。

➤ メインステップのプロトコール：

ステップ 1：細胞の固定と回収： Buffer A 使用

・使用前にBuffer AにDTTを添加してください。

ステップ 2：細胞の溶解： Buffer B、Buffer C、Buffer D 使用

・使用前に Buffer D に Protease inhibitor mix を添加してください。

ステップ 3：クロマチン断片化： Bioruptor™ 使用

ステップ 4：断片化クロマチンの解析：アガロースゲル電気泳動

➤ キットのゴール：

Shearing ChIP Kit の最適化されたバッファーを使った ChIP 用断片化クロマチンの調製

・**クロマチン断片化キットの利点**：Shearing ChIP Kit は ChIP Sonication Control Kit (日本未発売) の完成形です。ChIP Sonication Control Kit でクロマチン断片化の効率をモニターした後、この Shearing ChIP Kit を使って ChIP 用断片化クロマチンを大量に調製することができます。Diagenode の両キットは、高品質な断片化クロマチンを調製するためのユーザーフレンドリーなプロトコールと最適化されたバッファーを提供するために設計されています。

ChIP Sonication Control kit (日本未発売) を使って：断片化クロマチンの品質を見ることで超音波破碎の効率をモニターします。

ChIP Sonication Control Kit には、断片化の効率をモニターするポジティブコントロールとして、ホルムアルデヒド固定した細胞が含まれています。キットのコントロールと自身の細胞の両方で、「スモールスケール」でのクロマチン断片化を数回試すのに十分な試薬が入っています。

Shearing ChIP kit を使って：大量の ChIP 用断片化クロマチンを調製します。

Shearing ChIP Kit は、インダクションや処理済みの細胞を使って、クロマチン断片化を行うことができます。そして、このキットは ChIP Sonication Control Kit と比べると、「ラージスケール」でのクロマチン断片化キットで、プロトコールの最初のステップは細胞の培養と固定 (プロトコール ステップ 1、上記参照) です。

Shearing ChIP Kit には、 1.5×10^8 細胞を処理できるクロマチン断片化用バッファーが入っています。断片化クロマチンは ChIP に使用することができます。Diagenode の OneDay ChIP Kit 又はご自身の ChIP プロトコールを使って ChIP を行ってください。

・**OneDay ChIP Kit を使って：時間をセーブし、多くのサンプルを短時間で解析します。**

キットは多検体 ChIP 解析のために設計されており、ChIP 工程、及び PCR 用 DNA の回収をそれぞれ 2 時間 (合計 4 時間) で行うことができます。この新しい方法を使えば、細胞の回収から PCR 解析までを 1 日で行うことができます。キットには 60 回用と 180 回用の 2 形態があります。(日本では 60 回用のみ販売、180 回用は未発売)

Shearing CHIP Kit :

- **スターティングマテリアル：培養細胞**

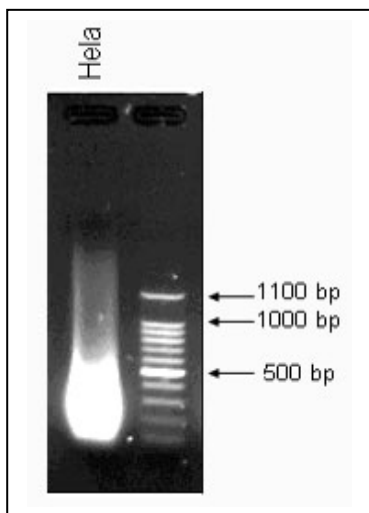


- **キットプロトコール ステップ 1 細胞の固定と回収**

カスタマーサンプル



- **キットプロトコール ステップ 2 細胞の溶解**
- **キットプロトコール ステップ 3 Bioruptor クロマチン断片化**
- **キットプロトコール ステップ 4 断片化クロマチンの解析**



DiagenodeのShearing CHIP KitとBioruptor™で得られた断片化クロマチンのアガロースゲル電気泳動

細胞を 1% ホルムアルデヒドで固定する（室温 10 分間）。
クロマチン断片化の前に、 3×10^6 細胞を 120 μ l の lysis buffer にサスペンドする。

1.5 ml チューブで、サンプルを [30 秒：“ON” / 30 秒：“OFF”] で 10 サイクル、Diagenode の Bioruptor™ で断片化する。

断片化クロマチンを 1% アガロースゲルで解析する。

右：Hela 細胞の断片化クロマチン

左：DNA 分子量マーカー



OneDay CHIP kit (又は あなた自身の “in house” CHIP プロトコール)

図2：キットメソッドの説明、ステップ バイ ステップ

クロマチン構造における転写因子の結合や変化の研究のために、ChIP解析を使ってください。ChIPメソッドの第1ステップは、ホルムアルデヒド固定後のクロマチンの単離と断片化です。免疫沈降 (IP) の前に、DiagenodeのShearing CHIP Kitを使ってChIPの第1ステップを確実にしてください。Shearing CHIP Kitは、ChIP用の高品質な断片化クロマチンを大量に調製することができます。そして、迅速ChIPプロトコールのOneDay CHIP Kitを使ってChIPを行ってください。

3. キットの構成

キット内容

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、各試薬は表1に示す温度で保存してください。

表1：キット内容と保存

内容	容量	コメント	保存
Buffer A (細胞回収)	18 ml	-	4
Buffer B (溶解1)	18 ml	界面活性剤、イオンキレート剤ミックスが含まれます。	4
Buffer C (溶解2)	18 ml	塩、イオンキレート剤ミックスが含まれます。	4
Buffer D (クロマチン断片化)	18 ml	界面活性剤、イオンキレート剤ミックスが含まれます。	4
1M DTT	230 μ l	100 \times ストック溶液です。	-20
Protease Inhibitor Mix (P.I.)	1 タブレット	Protease Inhibitor mixのタブレットを2 mlの水に溶解してください。 25 \times ストック溶液になります。 (ステップ2 - 参照)	-20

本品以外に必要な試薬・装置

試薬

- ・ホルムアルデヒド (37%ストック) *
- ・氷冷したPBSバッファー
- ・アガロース及びTAEバッファー
- ・DNA分子量マーカー
- ・1.25 M グリシン (オプション、プロトコールを参照)

装置

- ・セルスクレーパー
- ・1.5 mlチューブ用及び15 mlチューブ用遠心機 (4)
- ・密閉式超音波細胞破碎装置 Bioruptor™**
- ・アガロースゲル電気泳動装置
- ・インキュベーター又はウォーターバス (30)

*：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。

4. キットのアクセイブプロトコール

Shearing-ChIP Kitの進め方

断片化モジュール

----- クロマチン断片化 -----

細胞を培養しコンフルエントに達したら、下記のプロトコールを開始する。
ChIPアクセイ及びクロマチンの断片化に必要な細胞数とバッファース量については、下記表2及び
“スターティングマテリアル”の項を参照する。

Shearing ChIP Kitに入っている至適化されたバッファースを使用して、断片化クロマチンを調製する。下記表2にサンプルサイズに合わせたバッファース量を示す。1サンプルは最小で 6×10^6 細胞からなり、最大で 3×10^7 細胞のクロマチンを断片化することができる。それより多い細胞数を処理する場合は、スケールを調整する。OneDay ChIP Kitの免疫沈降 (IP) 1サンプルあたり、60 ~ 80 μ lの断片化クロマチンを使用するように調製する (表2)。

表2 : 1サンプルあたりのバッファース量 ステップ バイ ステップ -

	サンプル 最小サイズ	サンプル 最大サイズ
細胞数	6×10^6	3×10^7
DTT-Buffer A	600 μ l	3 ml
Buffer B	600 μ l	3 ml
Buffer C	600 μ l	3 ml
P. I. -Buffer D	240 μ l	1,200 μ l
ChIP アクセイ数 : 60 ~ 80 μ l -断片化クロマチン/OneDay ChIP (OneDay ChIP Kitのプロトコールを参照)	4 (最大)	20 (最大)

スターティングマテリアル 培養細胞

哺乳類の接着細胞を使用し、細胞がコンフルエントに達したら、下記のプロトコールを開始する。
ステップ 1~4の操作に従い、ChIP用の断片化クロマチンを調製する。

重要事項 :

- ・各ChIP解析には $1.5 \sim 2 \times 10^6$ 細胞分の断片化クロマチンが必要である。スケールは調整する。
- ・HeLa細胞の場合、コンフルエントまで培養した場合、175 cm^2 フラスコあたり約 3×10^7 細胞となり、それは20 IP分に相当する。
- ・サンプル数は、細胞のタイプや数、テストされる状態によって決まる。
インダクションや処理を受けた細胞についても、未処理の細胞と同様に扱うことができる。
- ・サンプルサイズは、サンプルあたりテストされるChIPの数で決まる。
1サンプルは、 6×10^6 細胞 ~ 3×10^7 細胞である (表2)。
- ・ 6×10^6 細胞のサンプルで4 IP、 3×10^7 細胞のサンプルで20 IPが行える (表2)。

ステップ 1 細胞の固定と回収

1. 37%ホルムアルデヒドを終濃度1%となるように、培養した細胞に直接添加する。
 - ・例:24 mlの培地に、667 μ lの37%ホルムアルデヒドを添加する。
 - ・ホルムアルデヒドはドラフト内で取り扱う。
2. ディッシュを回わしてホルムアルデヒドを混ぜ、室温で10分間インキュベートする(固定ステップ)。
3. 1/10量の1.25 M グリシンを添加し、室温で5分間インキュベートする(クロスリンクの停止)。
 - ・例:25 mlの[ホルムアルデヒド-培地]混合液に2.5 mlの1.25 Mグリシンを添加する。
 - ・又は、慎重にできる限りの培地を除去し、次のステップに進む。この場合は、ホルムホルムアルデヒドを残さないようにする。
4. ディッシュ上の溶液を取り除き、10 mlの氷冷したPBSで細胞を2回洗浄する。
5. 5 mlの氷冷したPBSを細胞に添加し、セルスクレーパーで細胞を回収する。細胞を15 mlチューブに移す。
6. 細胞数をカウントし、サンプルあたりの細胞数を決定する。
 - ・ 6×10^6 細胞が最小サイズ(表2)
 - ・ 3×10^7 細胞が最大サイズ(表2)
 - ・ChIPに使用する細胞の総数を考えて、細胞を分注する。
7. 遠心(3,000 \times g、4、5分間)して細胞を沈殿させ、上清を捨てる。
 - ・沈殿(細胞)は、-80 で数ヶ月間、凍結して保存することができる。
8. 遠心している間に、Buffer AにDTTを添加する。
 - 1 mlのBuffer Aに、10 μ lの1 M DTTを添加する(終濃度 10 mM DTT)。
 - ・ 1×10^7 細胞あたり、1 mlのフレッシュなDTT-Buffer Aが必要である(表2)。
9. フレッシュなDTT-Buffer Aを沈殿に添加し、沈殿をバッファーでサスペンドする。
 - ・添加するバッファー量については表2に示している。 1×10^7 細胞に1 ml添加する。
 - ・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捨てる。
10. 氷上で15分間インキュベートし、その後30 で15分間インキュベートする。
11. 軽くボルテックスして、遠心(3,000 \times g、4、5分間)し、上清は捨て、ホルムアルデヒドで固定された細胞の沈殿をキープする。
 - ・この段階で、細胞の沈殿を-80 で凍結することができる。
 - ・1つの沈殿は少なくとも 6×10^6 細胞を含む(表2)。
 - ・凍結した細胞の沈殿は、断片化クロマチンサンプルよりもずっと安定である。

ステップ 2 細胞溶解

12. ステップ 1で準備したホルムアルデヒド固定した細胞の沈殿を凍結した場合は、氷上で溶かす。
 - ・固定した細胞の凍結沈殿から始めることで、断片化とChIPの時間を1時間短縮することができる。
13. Buffer Bで細胞の沈殿を穏やかにサスペンドする。
 - ・添加するバッファー量については表2に示している。1×10⁷細胞に1 ml添加する。
14. 遠心 (3,000×g、4、5分間) し、静かに上清を捨てる。
15. Buffer Cに沈殿をサスペンドする。
 - ・添加するバッファー量については表2に示している。1×10⁷細胞に1 ml添加する。
16. 遠心 (3,000×g、4、5分間) し、上清は捨てる。
17. 遠心している間に、Protease Inhibitor Mix(P.I.)のタブレットを2 mlの水に溶かす。(25×ストック溶液となる。)使用後は、分注して、-20 で保存する。(4ヶ月以上安定である。)
18. 使用する前に、Protease Inhibitor Mix(P.I.)をBuffer Dに添加する。
400 μlのBuffer Dに16 μlのP.I.を添加する。
 - ・1×10⁷細胞あたり、400 μlのP.I.-Buffer Dが必要である (表2)。
19. フレッシュなP.I.-Buffer Dを沈殿に添加する。
20. 沈殿をバッファーでサスペンドする。(ステップ3の断片化で使用するクロマチンサンプル)断片化の前に、断片化していないクロマチンの一部(例: 10 μl)を新しいチューブにキープする。
 - ・クロマチンサンプルを断片化に使用する1.5 ml又は15 mlチューブに移す。
 - ・断片化していないクロマチンは、アガロースゲルで解析できる(ステップ 4)。

ステップ 3 クロマチン断片化

多くの哺乳類の細胞では、このプロトコルを使って良好な結果が得られている。少量のサンプル(3×10⁶細胞)で始め、細胞タイプに合わせて、断片化条件と固定プロトコルを至適化する。条件を一度至適化すれば、Shearing ChIP Kitを使ってChIP用の断片化クロマチンを大量に調製することができる。

21. Bioruptor™で各クロマチンサンプルを断片化する(パワー設定 High、氷冷)。
[30秒間: ON / 30秒間: OFF]で10サイクル、トータル10分間。
 - ・1.5 mlチューブで200 μlのサンプルを断片化する場合は、上記の条件を使用する。この条件は、多くの哺乳類の細胞系でテストされ、ChIP実験の結果も良好であった。
 - ・至適な断片化条件はChIPの効率にとって重要である。断片化条件は細胞タイプ、固定プロトコル、超音波装置に合わせて至適化する。DiagenodeのウェブページのBioruptor™ User manualのTroubleshooting guideを利用することもできる。
22. 断片化後、遠心 (10,000×g、4、5分間) し、新しいチューブに上清(断片化クロマチンサンプル)をキープする。沈殿(不溶性物質)は捨てる。

ステップ 4 断片化クロマチンの解析

断片化クロマチンの解析の詳細については、ChIP Sonication Ctr Kit(日本では未発売)のプロトコール(ステップ 4、Diagenodeのウェブページからダウンロード可)を参照。

- ・電気泳動の前に、次の方法でクロスリンクを解除することをすすめる。15 μ lの断片化クロマチンと、400 μ lのBuffer Dと、5 μ lのProteinase K(10 mg/ml)を混合し、65 $^{\circ}$ Cで少なくとも4時間インキュベートする(最短 4時間 / 最長 オーバーナイト)。

23. 1% アガロースゲルを準備する。

24. 1レーンあたり10 μ lのサンプルを使用し電気泳動解析を行う。ステップ 2-20. でキープした断片化していないクロマチンサンプルについても同時に解析する。断片化クロマチンDNAのサイズは、約300~1,000 bpとなる。

ChIP用 断片化クロマチン

Shearing-ChIP Kitには、 1×10^8 細胞のクロマチンを断片化するための試薬が入っている。ChIP用に断片化クロマチンは、あなた自身のプロトコールや、DiagenodeのOneDay ChIP Kit等で使用することができる。

25. 1 IPあたり1.5~2 $\times 10^6$ 細胞分(60~80 μ l)の断片化クロマチンを使用する。
下記のように、IPで使用する断片化クロマチンはIPインキュベーションミックスの最終容量に希釈される。

- ・断片化クロマチン1.5~2 $\times 10^6$ 細胞分(60~80 μ l)
- ・抗体結合ビーズ(界面活性剤なしのバッファーでブロックされ、IPインキュベーションミックスの総量の1:10に相当するもの)
- ・抗体
- ・BSAやその他のブロッキング試薬(非特異的な結合を避けたい場合や、バックグラウンドのシグナルを減少させたい場合)
- ・P.I. mix (プロテアーゼ阻害剤)
- ・IP バッファー、界面活性剤なし

重要事項:

- ・フレッシュな断片化クロマチンサンプルを、直接ChIPで使用するのがベストである。(例: OneDay ChIP Kit)
- ・断片化クロマチンを凍結し、別の日にChIPを行うことも可能である。クロマチンは液体窒素中で数ヶ月間凍結保存できる場合もあれば、ChIPのターゲットによっては数週間しか保存できないものもある。
- ・凍結した断片化クロマチンをChIPに使用することができるが、たいていはフレッシュなクロマチンの方が良好な結果が得られる(ヒストン修飾研究等)。断片化クロマチンサンプルは1ヶ月又は2ヶ月(-80 $^{\circ}$ C 保存)より長く保存すると、品質が低下する。
- ・転写因子の研究においては、断片化クロマチンの安定性はさらに短くなる。GR-ChIPアッセイ用に、断片化クロマチンを液体窒素(-80 $^{\circ}$ C ではない)で1~2週間保存することができる。TBP-ChIPアッセイ用には、断片化クロマチンは6ヶ月間保存することができる。

5. トラブルシューティングガイド

ステップ	問題	解決法
クロスリンク	クロスリンクが弱い	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。
	クロスリンクが強い	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、至適なクロスリンク時間を見つけるべきである。
	タンパク質には DNA に作用するユニークな方法がある。DNA に直接結合してはいないが、他の DNA 結合タンパク質と一緒に作用するタンパク質もある。	
	<i>in vivo</i> でのタンパク質とクロマチンの効率的な固定は 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ーであると思われる。	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/ホルムアミドと抗原エピトープの相対的な感度。慎重にクロスリンクを行うことが重要です。
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実験に必要な細胞の量は、細胞のタイプ、興味のあるタンパク質、使われる抗体によって決められる。	1 ChIPあたり 1.5×10^6 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コンポーネントに至適化されている。サンプルは冷やしておく。
断片化した DNA の電気泳動写真	DNA 断片の正確なサイズ	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。
	クロスリンクしたサンプルの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。15 μ l の断片化したクロマチンを 400 μ l の Buffer D、5 μ l の proteinase K 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。)
	大量の DNA のアガロースゲル上での移動は、真の DNA 断片を反映しない、低品質な写真へ導きます。	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 μ 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	1%より高濃度のアガロースゲルは使用せず、ゆっくりと泳動する。
	泳動バッファー濃度	ゲル上でスミアになる 0.5 \times TAE よりは、1 \times TAE 又は TBE を使用することが好ましい。
rpm / x g ?	遠心スピード	$g = 11.18 \times r \times (\text{rpm}/1000)^2$; r は回転半径 (mm) : http://www.msu.edu/~venkata1/gforce.htm

6. 参考資料

- Kuo M.H. and Allis C.D. 1999 *Methods* (3):425-33.
- Luger K., Mader A.W., Richmond R.K., Sargent D.F. and Richmond T.J. 1997 *Nature* 389(6648):251-60.

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/>