

---

---

# ChIP Reagents

～クロマチン免疫沈降(ChIP)法用 ストック溶液セット～

マニュアル (第2版)

---

---

Code No. 318-07131

NIPPON GENE CO., LTD.

目次
----

I	製品説明	1
II	セット内容	1
III	保存	2
IV	使用上の注意	2
V	使用例	2
	＜本品以外に必要な試薬、機器など＞	2
	1) 磁気ビーズと一次抗体の反応	3
	2)-1 細胞の調製（接着細胞の場合）	4
	2)-2 細胞の調製（浮遊細胞の場合）	5
	3) クロマチンの調製	6
	4) 一次抗体とクロマチンサンプルの反応と洗浄	7
	5) DNA 抽出	8
VI	参考資料	9

## I 製品説明

ChIP Reagents は、クロマチン免疫沈降（ChIP : chromatin immunoprecipitation）法のうち、化学架橋（クロスリンク）してからクロマチン断片を調製するクロスリンク（X-ChIP : cross-linked ChIP）法で使用するストック溶液のセットです。

本品 1 セットには、クロマチン免疫沈降を 30 回実施するための試薬が含まれております。ただし、2 M Glycine は、対象とする細胞によって使用回数が異なります。

## II セット内容

	(容 量)	(組 成)
1. 2 M Glycine	30 ml×1本	2 M Glycine
2. NP-40 buffer	250 ml×2本	10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM NaCl 0.5% NP-40
3. SDS Lysis buffer (*1)	10 ml×1本	50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1% SDS 10 mM EDTA
4. ChIP dilution buffer (*2)	50 ml×1本	50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 167 mM NaCl 1.1% Triton X-100 0.11% Sodium deoxycholate
5. 1×RIPA buffer -150 mM (*2)	160 ml×1本	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA (pH 8.0) 0.1% SDS 1% Triton X-100 0.1% Sodium deoxycholate
6. 1×RIPA buffer - 500 mM (*2)	50 ml×1本	500 mM NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA (pH 8.0) 0.1% SDS 1% Triton X-100 0.1% Sodium deoxycholate
7. ChIP direct elution buffer (*1)	50 ml×1本	10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 300 mM NaCl 5 mM EDTA (pH 8.0) 0.5% SDS
8. マニュアル	1部	

(\*1) SDS Lysis bufferおよびChIP direct elution buffer中に白い結晶が析出する場合がありますが、品質、性能に問題はありません。このような場合には、容器ごと37~65°Cでインキュベートし、結晶を完全に溶解させてからご使用ください。

(\*2) 使用時は氷冷し、使用直前にプロテアーゼ阻害剤を加えてください。なお、プロテアーゼ阻害剤は本品に含まれておりません (p. 2 参照) ので、添加量等については、使用するプロテアーゼ阻害剤の使用方法に従ってください。

### III 保存

ChIP Reagents に含まれる試薬はすべて室温保存が可能です。

### IV 使用上の注意

- 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。
- 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でください。

### V 使用例

1) 磁気ビーズと一次抗体の反応	P.3
2)-1 細胞の調製 (接着細胞の場合)	P.4
2)-2 細胞の調製 (浮遊細胞の場合)	P.5
3) クロマチンの調製	P.6
4) 一次抗体とクロマチンサンプルの反応と洗浄	P.7
5) DNA 抽出	P.8

この使用例についての詳細は、「VI参考資料」にあるエピジェネティクス実験プロトコールをご参照ください。また、用いる対象に応じて適切な反応条件を検討する必要があります。

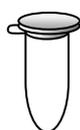
#### <ChIP Reagents以外に必要な試薬、機器など>

- 培地 DMEM (ロンザ/12-708Fなど)
- PBS (phosphate-buffered saline) (10×PBS Buffer、ニッポンジーン/314-90185)
- 16% パラホルムアルデヒド (富士フイルム和光純薬/043368)
- 蒸留滅菌水 (Distilled Water、ニッポンジーン/318-90105)
- プロテアーゼ阻害剤カクテル [Complete mini, EDTA-free(ロシュ・ダイアグノスティック/1 836 170)、プロテアーゼ阻害剤ミックス(富士フイルム和光純薬/160-19501)など]
- 0.5 mg/ml RNase A, DNase-free (ロシュ・ダイアグノスティック/1 119 915など)
- 20 mg/ml プロティナーゼK溶液 (富士フイルム和光純薬/162-22751)
- フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (PCI、ニッポンジーン/311-90151)
- クロロホルム (富士フイルム和光純薬/038-02606)
- 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) (ニッポンジーン/316-90081)
- 100%および70%エタノール
- アルコール沈殿用共沈剤 (Ethachinmate、ニッポンジーン/312-01791)
- TE [10 mM Tris-HCl (pH 8.0) , 1 mM EDTA] (ニッポンジーン/314-90021)

- 10%または20% SDS (10% SDS Solution、ニッポンジーン/311-90271)
- 目的のタンパク質を認識する抗体 (抗ヒストン修飾抗体など)
- コントロールIgG
  - ・ウサギポリクローナル抗体用: ChromPure Rabbit IgG. whole molecule (ジャクソンイムノリサーチ/011-000-003)
  - ・マウスモノクローナルIgG用: ChromPure Mouse IgG. whole molecule (ジャクソンイムノリサーチ/015-000-003)
- 磁気ビーズ
  - ・ウサギポリクローナル抗体用: Dynabeads® Protein G (インビトロジェン/100-03D, -04D)
  - ・マウスモノクローナルIgG用: Dynabeads® M-280 Sheep anti-Mouse IgG (インビトロジェン/112-01D, -02D)
- 超音波破碎機 [ブランソン社 Sonifier® 250 (マイクロチップ) など]
- 低吸着チューブ 1.5 ml Protein LoBindチューブ (エッペンドルフ/95292)
- 磁気スタンド Dynal MPC™-S (インビトロジェン/120-20D)

## 1) 磁気ビーズと一次抗体の反応 -----

### Dynabeads® けん濁液



1.5 ml チューブに Dynabeads® を必要量取り分ける

磁気スタンドに置き、1 分間静置

上清を除く

← 1 ml PBS で洗浄 (3 回繰り返す)

← 500  $\mu$ l RIPA buffer-150 mM で洗浄

← 500  $\mu$ l RIPA buffer-150 mM の添加

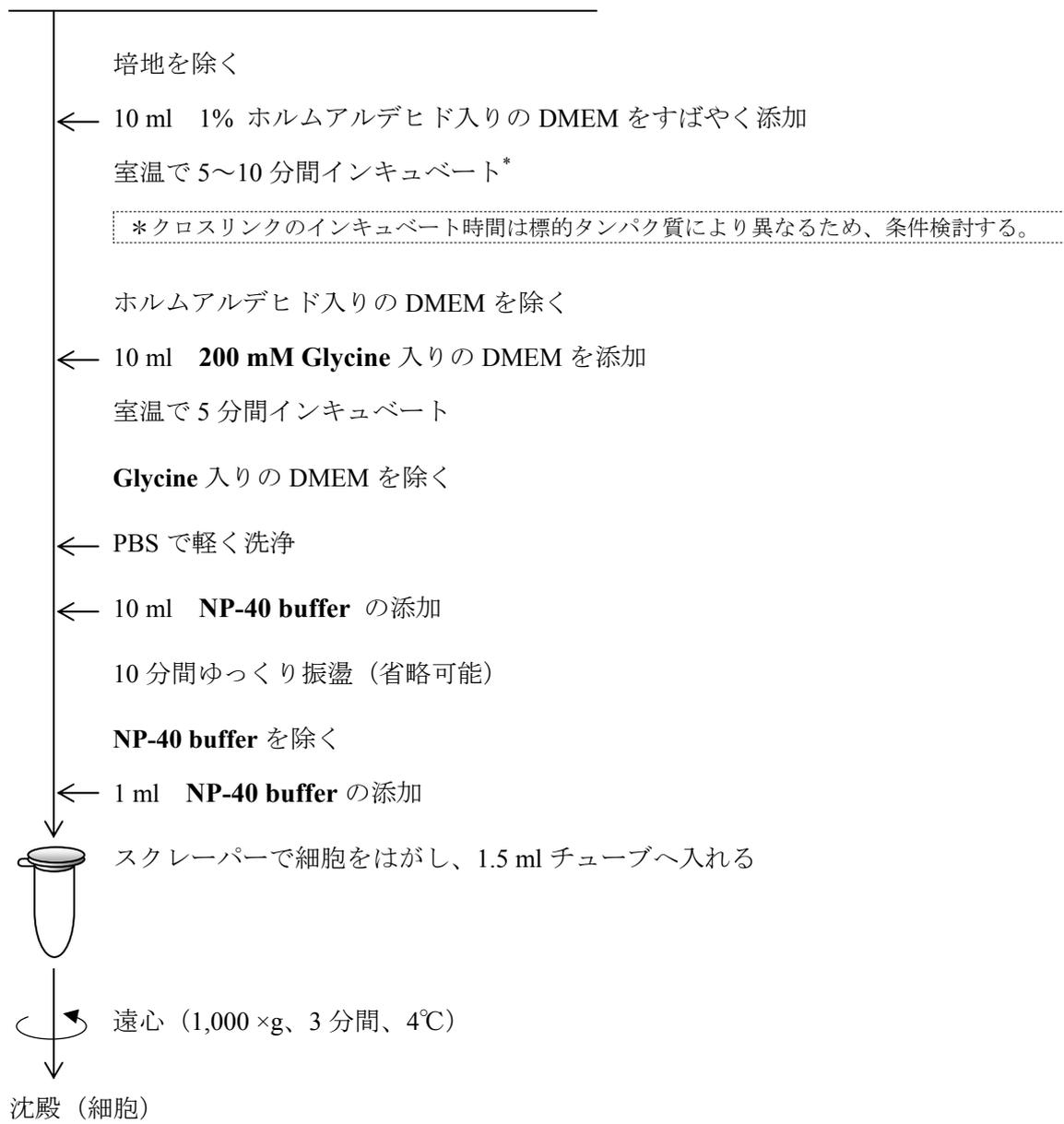
← 一次抗体 (0.5~5  $\mu$ g) の添加

4°C で 4 時間~一晩、ローテーターで混和しながらインキュベート

一次抗体を付加した磁気ビーズ

## 2)-1 細胞の調製 (接着細胞の場合)

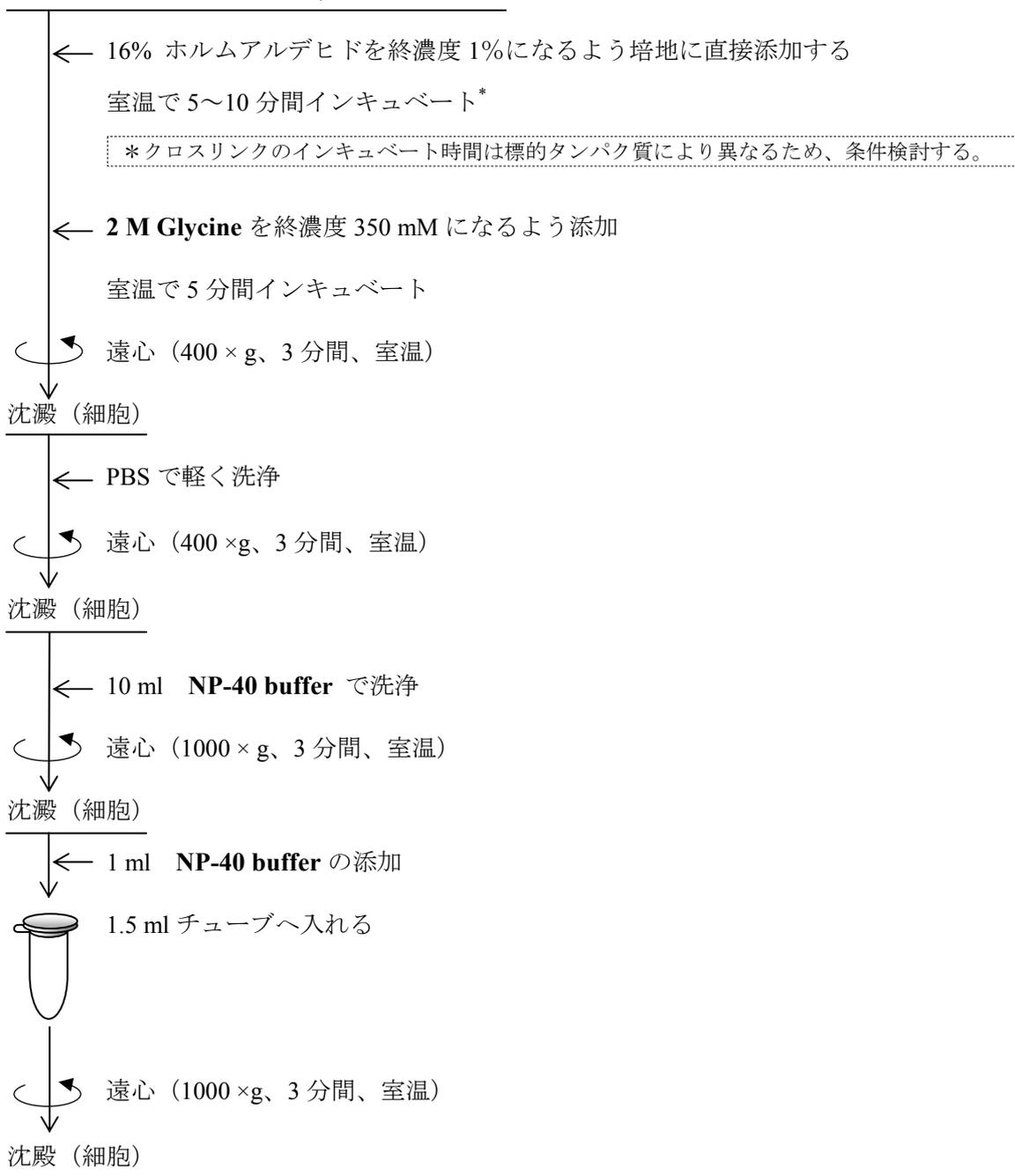
10 cm ディッシュで培養した細胞 ( $4\sim 5\times 10^6$  cells)



< 「3) クロマチンの調製」につづく >

## 2)-2 細胞の調製 (浮遊細胞の場合)

浮遊細胞 (1~5×10<sup>5</sup> cells/ml ; 10~20 ml 程度)



< 「3) クロマチンの調製」につづく >

### 3) クロマチンの調製

#### 沈殿 (細胞)

チューブを氷上に置き、冷やす\*

\*これ以降の操作は、氷上で行う。

← 100  $\mu$ l **SDS Lysis buffer** の添加

ピペットマンで、10 回程度懸濁

← 400  $\mu$ l **ChIP dilution buffer** を加え混合

超音波破碎を行う\*

\*予備実験により適切な条件を検討する (200~1,000 bp 程度の断片化クロマチンにする)。

遠心 (20,000  $\times$ g、10 分間、4°C)

#### 上 清 (断片化クロマチン)



上清を新しい 1.5 ml チューブへ移す

← 500  $\mu$ l **ChIP dilution buffer** を加え、計 1 ml にする



適量ずつ分注する

( → 分注したクロマチン溶液の一部を **input** として 4°C に保存)

#### クロマチン溶液\*

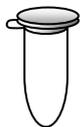
\*ヒストン修飾抗体を用いた場合、4~5 $\times$ 10<sup>6</sup> cells 分のクロマチンから 3 反応の ChIP 実験を行うことができる (ChIP dilution buffer を加え計 1 ml にしたクロマチン溶液から 300  $\mu$ l ずつ分注し、30  $\mu$ l を **input** とする)。

← **1 $\times$ RIPA buffer-150 mM** を加え、1 チューブあたり 500  $\mu$ l にする

#### クロマチンサンプル

#### 4) 一次抗体とクロマチンサンプルの反応と洗浄 -----

一次抗体を付加した磁気ビーズ



1) で調製したビーズを磁気スタンドで回収し、上清を除く

← 500  $\mu$ l 1 $\times$ RIPA buffer-150 mM (氷冷) で 2 回洗浄

← 3) で調製したクロマチンサンプルの添加

4 $^{\circ}$ Cで一晩、ローテーターで混和しながらインキュベート

ビーズを磁気スタンドで回収し、上清を除く

← 1 ml 1 $\times$ RIPA buffer-150 mM (氷冷) で 2 回洗浄

← 1 ml 1 $\times$ RIPA buffer-500 mM (氷冷) で洗浄

← 1 ml TE (氷冷) で洗浄

← 200  $\mu$ l ChIP direct elution buffer の添加

ここから、保存していた 3) の input も同時に行う\*

\*Input にも 200  $\mu$ l になるように ChIP direct elution buffer を加え、さらに SDS を最終濃度が 0.5%になるように加える。

65 $^{\circ}$ Cで 8 時間以上、インキュベート

← 2  $\mu$ l 500  $\mu$ g/ml RNase A の添加

37 $^{\circ}$ Cで 30 分間、インキュベート

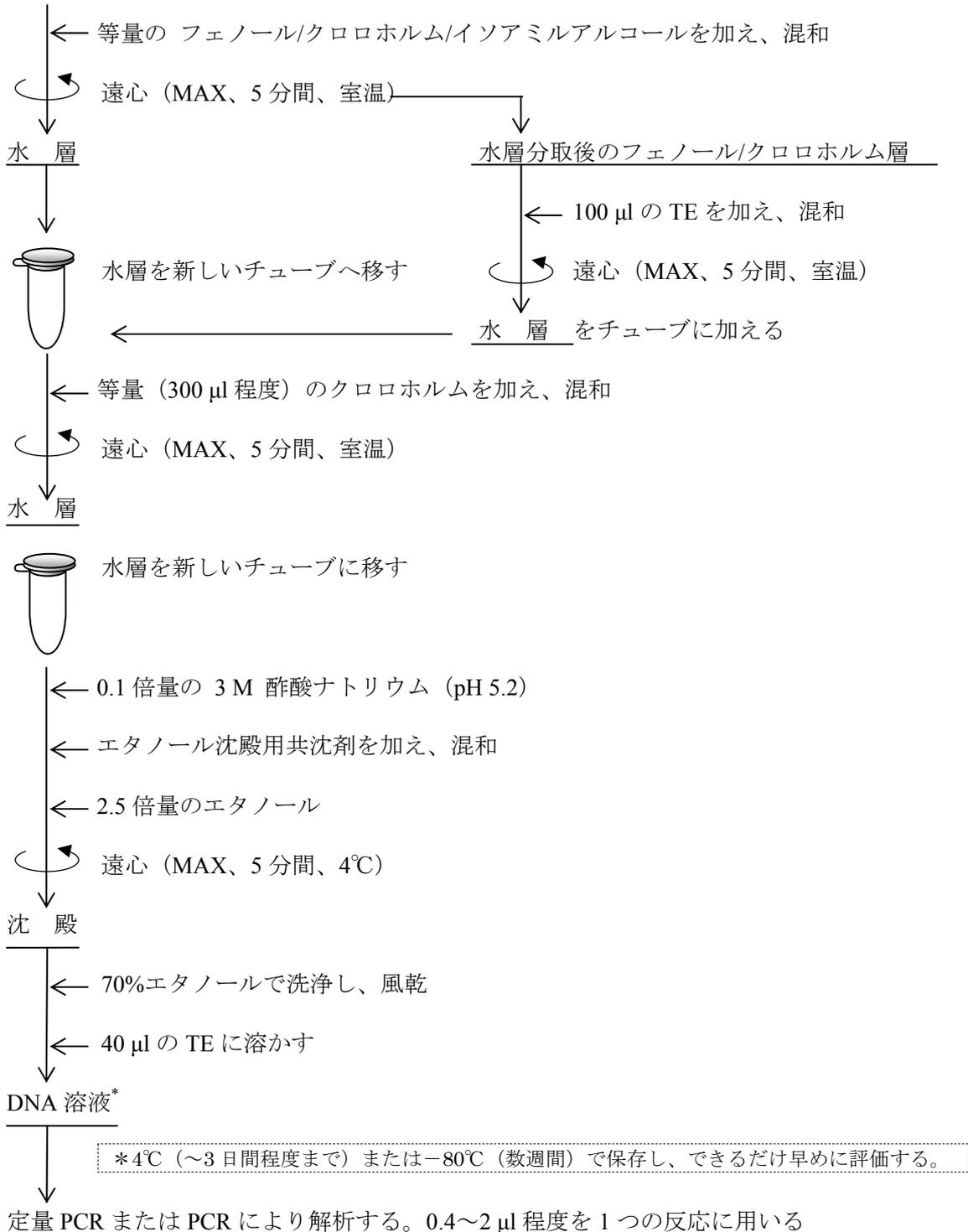
← 5  $\mu$ l 20 mg/ml プロテイナーゼ K の添加

55 $^{\circ}$ Cで 1~3 時間、インキュベート

↓  
< 「 5) DNA 抽出」のステップにつづく >

## 5) DNA 抽出

< 「4) 一次抗体とクロマチンサンプルの反応と洗浄」からのつづき >



## VI 参考資料

1. 実験医学別冊 注目のバイオ実験シリーズ「エピジェネティクス実験プロトコール」  
(羊土社、2008年10月発行) 第二章、p. 143-166:  
「クロマチン免疫沈降(ChIP)法」(林陽子、後藤友二、木村宏)

株式会社ニッポンジーン

TEL (076) 451-6548 FAX (076) 451-6547

URL <http://www.nippongene.com/siyaku/>